# Untersuchungen zur Charakterisierung von UDP-Glucuronyltransferasen in der Leber und in extrahepatischen Geweben der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
**Hans Ulrich Cramer von Clausbruch**
aus Rietheim-Weilheim

1979

# Untersuchungen zur Charakterisierung von UDP-Glucuronyltransferasen in der Leber und in extrahepatischen Geweben der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
**Hans Ulrich Cramer von Clausbruch**
aus Rietheim-Weilheim

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Februar 1979

Dekan: Professor Dr. W. Zeil

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. W. Bock

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Mecke

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.W. Bock im Institut für Toxikologie der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. Remmer) begonnen und im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. A. Hasselblatt) fertiggestellt.

Herrn Prof. Dr. K.W. Bock danke ich für die Überlassung des Themas, seine Hilfe bei allen Fragen der Versuchsgestaltung, sowie für wertvolle Ratschläge und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. D. Winne danke ich für die Präparation der isolierten Jejunalschlinge, Herrn Dr. H. Hoensch für die Methode zur Bestimmung der EOD-Aktivität.

Mein herzlicher Dank gilt den Tübinger und Göttinger Kollegen, die durch ihre hilfreiche Zusammenarbeit gute Arbeitsbedingungen ermöglichten.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0054

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung und Fragestellung | 1 |
| 2. | Materialien und Methoden | 13 |
| 2.1. | Chemikalien | 13 |
| 2.2. | Versuchstiere | 15 |
| 2.2.1. | Haltung der Tiere | 15 |
| 2.2.2. | Vorbehandlung der Versuchstiere | 15 |
| 2.3. | Proteinbestimmung nach Lowry et al. | 17 |
| 2.4. | Enzymatische Bestimmungen der GT | 19 |
| 2.4.1. | Glucuronidierung mit 1-Naphthol mod. nach (27, 90) Hinreaktion | 19 |
| 2.4.2. | Glucuronidierung mit 1-Naphthol nach (27) Rückreaktion | 20 |
| 2.4.3. | Morphinglucuronidierung mod. nach (102, 126, 127) | 21 |
| 2.4.4. | Bilirubinglucuronidierung mod. nach (114) | 23 |
| 2.5. | Enzymatische Bestimmung der Monooxygenase, Bestimmung der EOD-Aktivität mod. nach (64) | 25 |
| 2.6. | Präparation von Gewebshomogenaten | 27 |
| 2.7. | Mikrosomenpräparation | 28 |
| 2.8. | Reinigungsmethoden der GT | 29 |
| 2.8.1. | Präparation und Waschen der Mikrosomen | 29 |
| 2.8.2. | Ultraschallbehandlung | 29 |
| 2.8.3. | Solubilisieren mit Cholat | 30 |
| 2.8.4. | Ammoniumsulfatfällung | 30 |
| 2.8.5. | Gelfiltration an einer Bio-Gel$^{R}$-A-1,5m-Säule | 31 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 2.8.6. | Ionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule | 31 |
| 2.8.7. | Abtrennung des Detergens an einer Bio-Beads$^{R}$-SM-2-Säule mod. nach (57) | 32 |
| 2.8.8. | Affinitätschromatographie an UDP-Hexanolamin-Sepharose 4 B | 32 |
| 2.9. | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach (87) | 33 |
| 2.10. | Bestimmung der Metabolisierung in der isolierten Jejunalschlinge | 36 |
| 2.10.1. | Präparation der Jejunalschlinge | 36 |
| 2.10.2. | Bestimmung der gebildeten Metabolite | 36 |
| 2.11. | Enzymatische Spaltung mit ß-Glucuronidase bzw. Arylsulfatase | 36 |
| 2.12. | Bestimmung der Naphthalinmetabolisierung | 37 |
| 2.13. | Bestimmung der Benzpyrenmetabolisierung | 38 |
| 2.13.1. | Extraktion zur quantitativen Bestimmung der Metabolite | 38 |
| 2.13.2. | Nachweis der Benzpyrenmetabolite mod. nach (45) | 39 |
| 2.14. | Dünnschichtanalytische Bestimmungsmethode der Benzpyren- und Naphthalinmetabolite | 40 |
| 2.15. | Bestimmung der Radioaktivität | 40 |
| 3. | Ergebnisse | 42 |
| 3.1. | Reinigung der GT mit 1-Naphthol als Substrat | 42 |
| 3.2. | Vergleich der Hin- und Rückreaktion der Naphtholglucuronidierung im partiell gereinigten Enzym (DEAE-Cellulose-Stufe) mit dem membrangebundenen Enzym | 47 |
| 3.3. | Bestimmung der Glucuronidierung in verschiedenen Geweben | 53 |

Seite

3.3.1. Langzeitinduktion der GT in verschiedenen Geweben durch Aroclor 1254 58

3.3.2. Orale Induktion der GT im Darm durch Aroclor 1254 60

3.4. Metabolismus von Naphthalin und Benzpyren in der isolierten Jejunalschlinge 63

4. Diskussion 76

4.1. Reinigung der mikrosomalen GT mit 1-Naphthol als Substrat 76

4.2. Bestimmung der Glucuronidierung in verschiedenen Geweben 81

4.3. Metabolismus von Naphthalin und Benzpyren im perfundierten Darm 85

Literaturverzeichnis 91

## 1. Einleitung und Fragestellung

Unser Organismus wird in der heutigen Zeit immer häufiger mit Arzneimitteln und anderen körperfremden Stoffen konfrontiert. Deshalb gewinnt die Frage zunehmend an Bedeutung, wie der Organismus die Fremdstoffe metabolisiert, sie inaktiviert und schließlich eliminiert. Ein großer Teil dieser Stoffe ist lipophil und würde ohne Veränderung in der Niere rückresorbiert werden. Deshalb muß vor der Ausscheidung eine Umwandlung in hydrophile Stoffe stattfinden (31). Diese Veränderung erfolgt im allgemeinen in zwei Schritten (123). In der Phase-I-Reaktion erfolgt durch oxidative (Monooxygenasen), reduktive oder hydrolytische Metabolisierung eine derartige Veränderung, daß in der darauffolgenden Phase-II-Reaktion eine Konjugation an Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion oder Aminosäuren ermöglicht wird. Die Konjugationsreaktionen führen meist zur Inaktivierung der Fremdstoffe. Durch Überführung in eine wasserlösliche Form kann der Stoff eliminiert werden. Die Biotransformation wird durch unspezifische fremdstoffabbauende Enzymsysteme vorgenommen (11, 61, 70), die zum großen Teil im Leberparenchym vorhanden sind, aber auch in extrahepatischen Geweben (4, 5, 53, 83) gefunden wurden. Wichtige Enzyme der Phase-I- und Phase-II-Reaktion sind im endoplasmatischen Retikulum der Zelle lokalisiert und erscheinen nach Differentialzentrifugation in der Mikrosomenfraktion.

Es konnte gezeigt werden, daß viele lipidlösliche Verbindungen, die längere Zeit im Organismus verweilen, mikrosomale Enzymsysteme induzieren (98). Da oftmals der molekulare Mechanismus des Induktionsprozesses nicht geklärt ist, soll hier der Begriff "Induktion" als Steigerung der Enzymmenge verstanden werden, die durch Inhibitoren der Proteinsynthese verhindert werden kann (23). Viele Xenobiotika haben sich als starke Induktoren der mikrosomalen Enzyme erwiesen wie zum Beispiel Barbiturate (insbesondere Phenobarbital) (25, 85, 99, 96, 97), cancerogene polyzyklische Kohlenwasserstoffe (z.B. 3-Methylcholanthren, Benzo(a)pyren) (25, 31, 62, 37, 38), Antibiotica wie Rifampicin (100), Insectizide aber auch Schadstoffe wie zum Beispiel TCDD oder polychlorierte Biphenyle (32).

Eines der wichtigsten Enzyme der Phase-I-Reaktion ist die mikrosomale Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenase. Eine Vielzahl von Resultaten macht deutlich, daß die Mikrosomenfraktion mehrere Formen von Cytochrom P 450 enthält. Vorbehandlung der Ratten mit 3-Methylcholanthren führt zur Synthese einer Form von Cytochrom P 450 mit veränderten Spektraleigenschaften, das Cytochrom P 448 (9) genannt wurde. Cytochrom P 450 konnte von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten, Cytochrom P 448 von Ratten, die mit 3-Methylcholanthren vorbehandelt waren, gereinigt werden (101).

Die gereinigten Cytochrome unterscheiden sich in ihren Spektraleigenschaften (CO-Differenz-Spektrum) und in den Substraten, die sie bevorzugt umsetzen. Wie durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese festgestellt wurde, besitzen die gereinigten Formen unterschiedliche Molekulargewichte (77).

Das quantitativ wichtigste Enzym der Phase-II-Reaktion bildet die in der vorliegenden Arbeit untersuchte UDP-Glucuronat-Glucuronyltransferase (E.C. 2.4.1.17; im folgenden Text mit "GT" abgekürzt), die als relativ unspezifisches Enzym den Glucuronsäurerest von UDP-Glucuronsäure (42) auf folgende Akzeptorgruppen überträgt:

- Phenolische OH-Gruppen (62)
- Carboxylgruppen (40)
- Aminogruppen (13, 12, 15)
- Thiolgruppen (36, 41)

Es läßt sich folgendes Schema der Glucuronidbildung angeben:

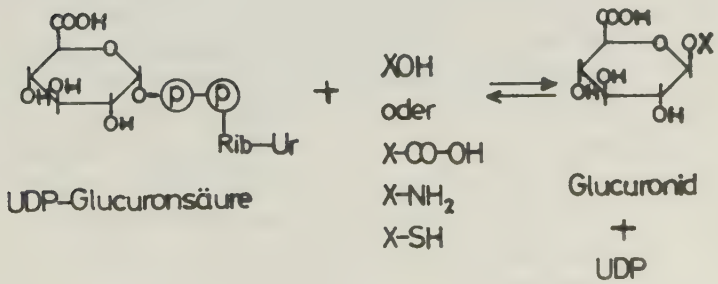
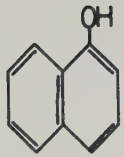



Abbildung 1.

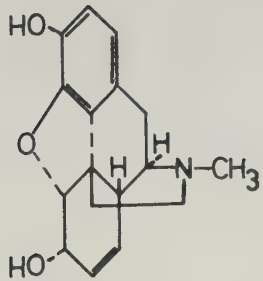
Zu den Substraten der GT zählen endogene Stoffe und exogene Substrate wie viele Pharmaka. Zur Untersuchung der Eigenschaften der GT wurden oftmals Modellsubstrate verwendet, die zur Klärung vieler Fragen wegen der Einfachheit und Empfindlichkeit der Bestimmungsmethoden beitrugen.

Bis heute ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob die GT als ein Enzymprotein mit Multisubstratspezifität vorliegt oder aus mehr als einer katalytischen Einheit besteht. Die GT erweist sich beispielsweise als differentiell induzierbar. Die Konjugation einer Gruppe von Substraten (1-Naphthol, p-Nitrophenol) wird bevorzugt durch Methylcholanthrenbehandlung stimuliert, die Glucuronidierung einer anderen Gruppe (Morphin, Chloramphenicol, Bilirubin) hauptsächlich durch Phenobarbital verstärkt (25). Auch bei der Entwicklung der foetalen Ratte wird die Glucuronidierung verschiedener Substrate der GT unterschiedlich stimuliert (125). Diese Befunde zeigen folglich eine funktionelle Heterogenität der GT auf. Bislang konnte nach teilweiser Reinigung der GT eine Auftrennung in Fraktionen erreicht werden, die verschiedene Substrate bevorzugt umsetzen unter starkem Verlust der enzymatischen Aktivität für andere Substrate (22, 118, 108, 58, 119). Die molekulare Basis der Heterogenität kann jedoch nur durch Reinigung der Enzymformen bis zur Homogenität aufgezeigt werden.

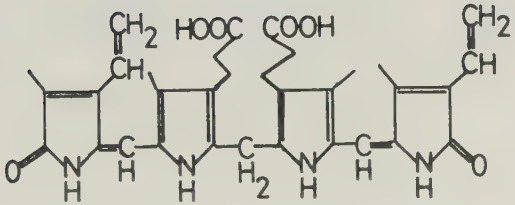
Eine besondere Schwierigkeit bei der biochemischen Bearbeitung der GT ist dadurch gegeben,




1-Naphthol




Morphin




Bilirubin

Abbildung 2: Substrate der GT

daß sie als membrangebundenes Enzym stark von den Lipiden der Membranumgebung abhängig ist. Im In-Vitro-Experiment zeigt die GT eine Latenz, d.h. durch verschiedene Behandlungsmethoden kann die Aktivität des Enzyms in kürzester Zeit bis zu 40-fach gesteigert werden. Recht unterschiedliche Aktivierungsmethoden sind bekannt wie Behandlung mit Detergentien (25, 50, 81, 85) oder Ultraschall (55, 84), Spontanaktivierung durch Alterung (80, 81) oder Verdauung mit Trypsin (52). Auch die Zugabe eines allosterischen Aktivatorstoffes (UDP-NAG) (116, 115, 117) bewirkt eine starke Steigerung der Enzymaktivität. Als Erklärung hierfür werden vor allem zwei Modelle angeführt.

1. Kompartimentierungsmodell (19)

Beim Kompartimentierungsmodell wird angenommen, daß das aktive Zentrum der GT dem intrazisternalen Raum des endoplasmatischen Retikulums zugewandt ist (10, 18, 52, 55, 80, 85). Da der intrazisternale Raum selbst für niedermolekulare polare Verbindungen nicht frei zugänglich ist, bildet die mikrosomale Membran für die hydrophile UDPGA eine starke Permeationsbarriere (89). Aus diesem Grund wird für den Transport der UDPGA in den intrazisternalen Raum eine Permease postuliert. Die Stimulierung der Glucuronidierung durch UDP-NAG, $Mg^{++}$-Ionen und durch Störung der Membranstruktur und die Hemmung des Enzyms durch UTP, UDP, UDP-Glucose u.a. wurde wie folgt erklärt:

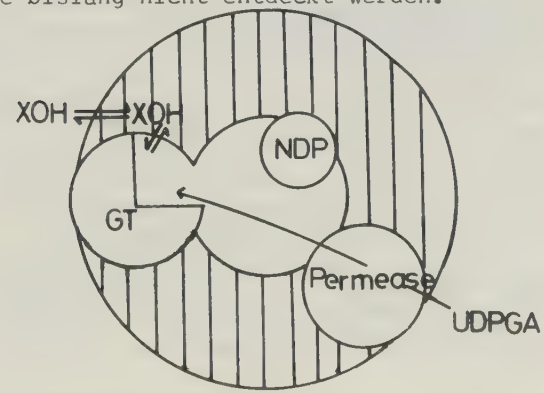
a) UDP-NAG erhöht die Aktivität der Permease für UDPGA. Die UDPGA-Konzentration im intrazisternalen Raum wird dadurch erhöht.

b) Auch $Mg^{++}$-Ionen sollen die Permease stimulieren. Außerdem soll eine stark $Mg^{++}$-abhängige Nukleosid-Diphosphatase das gebildete UDP spalten und damit die Reaktion irreversibel machen.

c) Bei Störung der Membranstruktur wird eine volle Aktivierung der GT erreicht. Die Permeationsbarriere für polare Substanzen soll dabei aufgehoben werden und der intazisternale Raum für UDPGA frei zugänglich.

d) UTP, UDP und der UDPGA verwandte Zucker werden von der Permease nicht transportiert. Nach Veränderung der Membranstruktur können sie jedoch zur GT gelangen und hemmend wirken.

Die bei diesem Modell diskutierte Permease konnte bislang nicht entdeckt werden.




NDP= Nukleosid-Diphosphatase

XOH= lipophiler Fremdstoff

Abbildung 3: Kompartimentierungsmodell

2. Konformationsmodell (129)

Die GT liegt in verschiedenen Konformationszuständen vor. Bei intakter Membranstruktur wird durch die Wechselwirkung des Enzyms mit den Phospholipiden der Membran eine Konformation mit eingeschränkter Aktivität stabilisiert. Damit lassen sich Aktivierung bzw. Hemmung folgendermaßen erklären:

a) Das Enzym kann im Zustand eingeschränkter Aktivität in Gegenwart von $Mg^{++}$-Ionen durch UDP-NAG allosterisch aktiviert werden (130).

b) Bei intakter Membran und Anwesenheit des allosterischen Aktivators UDP-NAG ist die GT spezifisch für UDPGA. UTP, UDP und UDP-Glucose zeigen folglich geringe Hemmwirkung.

c) Durch Membranschädigung geht die Konformation mit eingeschränkter Aktivität in eine mit stark erhöhter katalytischer Aktivität über. Mit dieser Konformationsänderung verliert das Enzym jedoch die allosterische Aktivierbarkeit und die Spezifität für UDPGA. Die hemmende Wirkung der Uridin-Nukleotide kann sich nun voll entfalten.

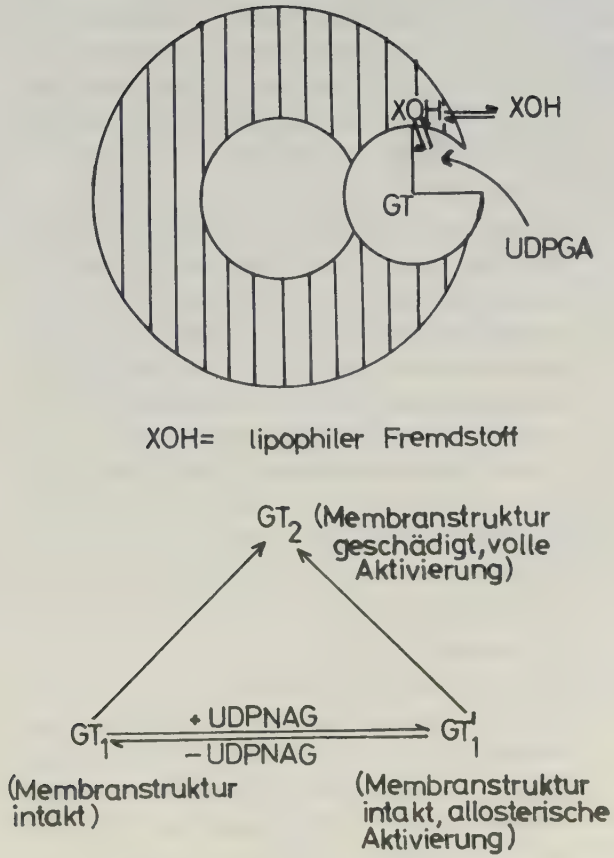



Abbildung 4: Konformationsmodell

Durch neuere Untersuchungen (131) konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß das aktive Zentrum Zugang zur Lipidphase hat.

die vorliegende Dissertation ist Teil eines Programms mit der Zielsetzung, UDP-Glucuronyltransferasen in den verschiedenen Geweben des Organismus zu charakterisieren und deren Bedeutung bei der Elimination und Inaktivierung von Fremdstoffen und körpereigenen Substanzen aufzuklären. Zu Beginn der Arbeit stellten sich folgende Probleme:

1) Wegen der im vorangehenden besprochenen Komplexität der bei der membrangebundenen GT beobachteten Phänomene (funktionelle Heterogenität, differentielle Induzierbarkeit, Lipidabhängigkeit des Enzyms, Einschränkung der maximalen Enzymaktivität durch die Membranstruktur usw.) ergab sich die Notwendigkeit, zunächst eine der Formen des Enzyms bis zur Homogenität zu reinigen und die Eigenschaften des reinen Enzyms mit denen des membrangebundenen Enzyms zu vergleichen.

2) Da zunehmend viele toxische Reaktionen mit dem Fremdstoffmetabolismus in extrahepatischen Geweben in Zusammenhang gebracht werden, sollten auch extrahepatische GT's untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf die Frage, ob Unterschiede in der Substratspezifität der GT in den einzelnen Geweben nachweisbar sind.

3) Zur Untersuchung der Bedeutung von Oxidation und Konjugation im intakten Organ sollte als Beispiel der Metabolismus von Naphthalin und Benzo(a)pyren im Rattendünndarm studiert werden. Dieses Organ hat als Ort primären Kontakts des Organismus mit Fremdstoffen besondere toxikologische Bedeutung. Der Metabolismus wurde im Modell der vasculär perfundierten isolierten Dünndarmschlinge untersucht, weil dieses Modell einerseits eine exakte Bilanzierung der Metabolite ermöglicht, andererseits der Dynamik des offenen metabolischen Systems, wie es in vivo vorliegt, sehr nahe kommt. Außerdem war eine Arbeitsgruppe im Institut für Pharmakologie der Universität Tübingen (unter Prof. Dr. D. Winne), die dieses Modell beherrscht, zur Zusammenarbeit bereit.

Im Text verwendete Abkürzungen:

| | |
|---|---|
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EOD | Ethoxycumarindeaethylase |
| GSH | Glutathion |
| GT | UDP-Glucuronyltransferase (E. C. 2. 4. 1. 17) |
| SDS | Dodecylsulfat, Natriumsalz |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TMED | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UDP | Uridin-5'-diphosphat |
| UDP-NAG | Uridin-5'-diphospho-N-acetyl-glucosamin |
| UTP | Uridin-5'-triphosphat |

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Atlas Chemie
Brij 58

Behringwerke, Marburg/Lahn
Serumalbumin vom Rind

Bio-Rad-Laboratories, Richmond
Bio-Gel$^{R}$ A 1,5 m (100-200 mesh)
Bio-Beads$^{R}$ SM-2 20-50 mesh

Fa. Boehringer, Mannheim
Katalase (Rinderleber)
Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxydiert
Uridin-5'-diphospho-glucuronat Dinatriumsalz
(UDPGA 78% Reinheit)
Uridin-5'-diphosphat Dikaliumsalz, kristallisiert
(UDP)
Isocitratdehydrogenase (Schweineherz) 20 U/ml

Fa. Fluka, Eschborn
Cholsäure, Natriumsalz
Anthranilsäureäthylester

Lumac Systems AG
Aqua Luma$^{R}$

Monsanto Company, St. Louis
Aroclor$^{R}$ 1254

New-England Nuclear, Boston
Protosol$^{R}$

Radiochemikal Centre, Amersham
($G$-$^{3}H$)-Benzo(a)pyren (20 - 30 Ci/mMol)
1-(1-$^{14}C$)-Naphthol (20,1 mCi/mMol)
(1-$^{14}C$)-Naphthalin (2,55 mCi/mMol)
(N-Methyl-$^{14}C$)-Morphin Hydrochlorid (40 - 60 mCi/mMol)

Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover
Diäthyläther
Benzol

Fa. Roth, Karlsruhe
2,6-Ditert.-butyl-p-kresol
Benzo(a)pyren

Fa. Serva-Feinbiochemica, Heidelberg
Acrylamid
Ammoniumpersulfat
Cellulose-Ionenaustauscher Servacel$^{R}$ Type DEAE 23 SS
Coomassie Brillant Blue$^{R}$ R-250
Digitonin
Dodecylsulfat-Natrium-Salz (SDS)
ß-Glucuronidase (Rinderleber) 20 U/g
ß-Glucuronidase/Arylsulfatase (Helix pomatia)
D,L-Isocitronensäure-Trinatrium-Salz
N,N'-Methylenbisacrylamid
N,N,N', N'-Tetramethyläthylendiamin (TMED)

Fa. Sigma-Chemicals, St.Louis
Lysolecithin von Ei-Lecithin
20-Methylcholanthren (3-Methylcholanthen)
a-Naphthyl-ß-D-Glucuronsäure, Natrium-Salz
Ovalbumin
D-Saccharo-14-lacton

Fa. Merck, Darmstadt
Sämtliche nicht besonders aufgeführten Substanzen.

## 2.2. Versuchstiere

### 2.2.1. Haltung der Tiere

Männliche Wistarratten (180-250 g) erhielten eine Standarddiät mit 20% Protein (Altromin$^{R}$, Lage/Lippe) und Trinkwasser ad libitum.

### 2.2.2. Vorbehandlung der Versuchstiere

1. Kontrollratten
   unbehandelte Tiere, Futter und Trinkwasser siehe oben

2. Vorbehandlung der Ratten mit 3-Methylcholanthren
   Die Tiere erhielten eine einmalige Dosis von 40 mg 3-Methylcholanthren/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert als 1,6%ige Lösung in Olivenöl (= 0,5 ml für ein Tier von 200 g). Zur Lösung des Methylcholanthrens wurde das Olivenöl erwärmt. Anschließend erhielten die Ratten Futter und Trinkwasser ad libitum Am 5. Tag wurden die Ratten getötet.

3. Vorbehandlung der Ratten mit Aroclor 1254
   a) Intraperitoneale Vorbehandlung
   Die Tiere erhielten eine einmalige Dosis von 500 mg Aroclor 1254/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert als 50%ige Lösung in Olivenöl. (=1 ml für eine Ratte von 200 g). Anschließend erhielten die Ratten bis zur Tötung Futter und Trinkwasser ad libitum.

4. Orale Vorbehandlung mittels Schlundsonde
   Die Tiere erhielten eine einmalige Dosis von 80 mg/kg Aroclor 1254 als 8%ige Lösung in Olivenöl (= 0,2 ml für ein Tier von 200 g) sondiert. Je nach Versuchsbedingung wurden die Ratten 24 Stunden vor Tötung nüchtern gesetzt oder erhielten bis zur Tötung Futter und Trinkwasser ad libitum.

Die restlichen Lösungen von Methylcholanthren bzw. Aroclor 1254 in Olivenöl wurden durch Versetzen mit Chromschwefelsäure und mehrtägiges Stehenlassen entfernt.

2.3. Proteinbestimmung nach Lowry et al. (74)

a) Proteinbestimmung für größere Mengen an Protein

| | |
|---|---|
| Proteinlösung | 0,5 ml (ca. 0,05-0,4 mg Prot.) |
| 1 N NaOH | 0,5 ml |
| alkalisches Kupferreagenz[1] | 5,0 ml |

gut umschütteln und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehenlassen.

Zugabe von

| | |
|---|---|
| Folin-Ciocalteus Phenolreagenz[2] | 0,5 ml |

Gut durchmischen und nach 30 Minuten die Extinktion bei 720 nm messen gegen einen Reagentienleerwert (alle Lösungen außer Protein). Eichkurve (für jede Messung neu erstellt) mit Rinderserumalbumin (0,1-0,4 mg)

b) Proteinbestimmung für kleinere Proteinmengen

| | |
|---|---|
| Proteinlösung | 1,0 ml (10-80 ug) |
| 30%ige Trichloressigsäure (TCA) | 0,4 ml |
| 2%ige Desoxycholatlösung | 0,02 ml |

30 Minuten unter Eiskühlung stehenlassen, 20 Minuten abzentrifugieren bei 3000 g, Flüssigkeit ausschütten und abtropfen lassen. Zugabe von

| | |
|---|---|
| dest. Wasser | 0,1 ml |
| 1 N NaOH | 0,1 ml |
| alkalisches Kupferreagenz[1] | 1,0 ml |

Gut durchmischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehenlassen.

Zugabe von

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz[2] 0,1 ml

Gut durchmischen und nach 30 Minuten die Extinktion bei 720 nm messen gegen einen Reagentienleerwert.

[1] alkalisches Kupferreagenz

| | |
|---|---|
| 2,0%ige $Na_2CO_3$-Lösung | 50,0 ml |
| 2,7%ige K-Na-Tartrat-Lösung | 0,5 ml |
| 1,0%ige $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-Lösung | 0,5 ml |

[2] Folin-Ciocalteus Phenolreagenz:
Fertigreagenz Merck wird mit dest. Wasser zu gleichen Teilen gemischt.

## .4. Enzymatische Bestimmungen der GT

### .4.1. Glucuronidierung mit 1-Naphthol mod. nach (27, 90)

Hinreaktion

-Radioaktive Bestimmung-

| Inkubationsansatz | | Endkonz. |
|---|---|---|
| 1 M Tris-HCl pH 7,4 | 0,05 ml | 100 mM |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0,05 ml | 5 mM |
| 5 mM 1-Naphthol (0,2%ig in Dimethyl-sulfoxid) | 0,05 ml | 0,5 mM |
| $^{14}C$-1-Naphthol (1 µCi/ml) | 0,05 ml | 0,05 uCi |
| Enzymprobe | 0,05-0,25 ml | |
| 30 mM UDPGA | 0,05 ml | 3 mM |
| dest $H_2O$ ad | 0,5 ml | |

Nach einminütiger Vorinkubation bei 37°C

Zugabe der UDPGA

Inkubation je nach Testbedingung zwischen 0,5 und 5 Minuten. Abstoppung der Reaktion durch

Zugabe von 0,5 ml Glycin-TCA-Puffer pH 2,2 (0,6 M Glycin, 0,4 M TCA). Abzentrifugieren des ausgefällten Proteins 5 Minuten bei 3000 g. Extraktion des nicht umgesetzten 1-Naphthols von 0,5 ml des Überstandes mit 8 ml Chloroform. (30 Sekunden intensives Schütteln, 5 Minuten zentrifugieren bei 3000g. Auszählen von 0,1 ml der wässrigen Phase in Aqua Luma$^R$. Nullwerte, bei denen Glycin-TCA-Puffer (Stoppreagenz) vor der Zugabe der UDPGA zugesetzt wurden, wurden von den Meßwerten substrahiert.

2.4.2. Glucuronidierung mit 1-Naphthol nach (27)
Rückreaktion

-Fluorimetrische Bestimmung-

| Inkubationsansatz: | | Endkonz. |
|---|---|---|
| 1 M Tris-HCl pH 7,4 | 0,10 ml | 100 mM |
| 100 mM $MgCl_2$ | 0,05 ml | 5 mM |
| 100 mM Naphtholglucuronid | 0,10 ml | 10 mM |
| 30 mM UDP | 0,10 ml | 3 mM |
| Enzymprobe | 0,1-0,4 ml | |
| dest $H_2O$ ad | 1,00 ml | |

Nach einminütiger Vorinkubation

Zugabe der Enzymprobe zum Starten der Reaktion. Inkubation je nach Testbedingung zwischen 1 und 4 Minuten. Abstoppung der Reaktion durch

Zugabe von 2 ml 0,05 N NaOH.

Messung des gebildeten Naphthols an einem Spektrofluorometer (Erregungswellenlänge 330 nM, Emissionswellenlänge 460 nM).

Aus einer Eichgeraden mit 1 bis 20 nM Naphthol wird die gebildete Naphtholmenge abgelesen. Nullwerte ohne UDP werden von den Meßwerten subtrahiert.

.4.3. Morphinglucuronidierung mod. nach (102, 126, 127).

-Radioaktiver Test-

| Inkubationsansatz: | | Endkonz. |
|---|---|---|
| 1M Tris-HCl pH7,4 | 0,05 ml | 100 mM |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0,05 ml | 5 mM |
| 15 mM Morphin-HCl | 0,05 ml | 1,5 mM |
| $^{14}$C-Morphin-HCl (2,5 µCi/ml) | 0,05 ml | 0,125 µCi |
| Enzymprobe | 0,10-0,25 ml | |
| 30 mM UDPGA | 0,05 ml | 3 mM |
| dest. $H_2O$ ad | 0,50 ml | |

Start der Reaktion durch Zugabe der UDPGA

Inkubation zwischen 10 und 20 Minuten.

Unterbrechung der Enzymreaktion durch Zugabe von 0,25 ml 10%iger Trichloressigsäure. Abzentrifugieren des ausgefällten Proteins, 0,5 ml der Überstände wurden in Zentrifugengläser überführt, die folgende Mischung enthalten:

| | |
|---|---|
| 1 N NaOH | 0,10 ml |
| dest. $H_2O$ | 0,15 ml |
| 0,05%ige Morphin-HCl-Lösung | 0,25 ml |
| 40%ige $K_2HPO_4$-Lösung | 0,50 ml |

2-malige Extraktion mit jeweils 7,5 ml 1,2-Dichloräthan/n-Amylalkohol (Verhältnis 7:3) 30 Minuten lang am Rotationsschüttler.

0,1 ml der wässrigen Phase werden in Aqua Luma$^R$ gezählt.

Berechnung der GT-Aktivität der radioaktiven Bestimmungsmethoden (2.4.1 und 2.4.3):

$$\frac{\text{nMol}}{\text{Min.x mg Prot.}} = \frac{\text{cpm x V x nMol Substrat}}{\text{STD x 1 x mg Protein}}$$

| | | |
|---|---|---|
| cpm | : | Counts/Min. (Zählung im Flüssigkeitsszintillationszähler) |
| V | : | Verdünnungsfaktor |
| nMol Substrat | : | eingesetzte Substratmenge |
| STD | : | Gesamtradioaktivität (cpm) im Test |
| mg Protein | : | Proteinmenge im Test |
| t | : | Inkubationszeit |

.4.4. Bilirubinglucuronidierung mod. nach (114)

-Photometrische Bestimmung-

| Inkubationsansatz: | | Endkonz. |
|---|---|---|
| 1 M Tris-HCl pH 7,4 | 0,1 ml | 100 mM |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0,1 ml | 5 mM |
| 1,0 mM Bilirubin (3 mg/5 ml 0,1 M $Na_2CO_3$) | 0,1 ml | 100 µM |
| Enzymprobe | 0,1-0,5 ml | |
| 30 mM UDPGA | 0,1 ml | 3 mM |
| dest. $H_2O$ ad | 1,0 ml | |

Start der Reaktion durch

Zugabe der UDPGA

Inkubation je nach Testbedingung zwischen 10 und 40 Minuten.

Abstoppen der Reaktion durch

Zugabe von 2,0 ml Glycin-Puffer[1] pH 2,7

Sofortige Zugabe unter Umschütteln von 1,0 ml Diazoreagenz[2]. 30 Minuten bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehenlassen.

Zugabe von 0,5 ml 8% Ascorbinsäure.

Extraktion mit 3 ml Methylpropylketon/Butylacatat (Verhältnis 17:3). Nach intensivem Schütteln und anschließender Zentrifugation wird die organische Phase abgehoben und die Extinktion bei 530 nm gemessen.

[1]Glycin-Puffer pH 2,7

0,4 N HCl mit kristallinem Glycin auf pH 2,7 einstellen.

[2]Diazo-Reagenz:

| | |
|---|---|
| 0,15 N HCl | 10,0 ml |
| Anthranilsäureäthyl-ester | 0,1 ml |
| $NaNO_2$ (5 mg/ml) | 0,3 ml |

5 Minuten stehenlassen.

Zugabe von

| | |
|---|---|
| Ammoniumamidosulfonat (171 mg/ml) | 0,1 ml |

Nach 3 Minuten benützen.

.5. Enzymatische Bestimmung der Monooxygenase

Bestimmung der EOD-Aktivität mod. nach (64)[x)]

| Inkubationsansatz: | | Endkonz. |
|---|---|---|
| 1 mM Ethoxycumarin (in 0,1 M K-Phosphat-puffer) | 0,25 ml | • 0,5 mM |
| Enzymprobe | 0,25 ml | |
| 50 mM NADPH | 0,005 ml | 0,5 mM |
| | 0,505 ml | |

Starten der Reaktion durch Zugabe von NADPH-Lösung. Inkubation bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Bewegen. Abstoppung der Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml Äther nach 30 Minuten. 2 ml der Ätherphase in spitze Zentrifugengläser überführen. Äther bei 37°C im Wasserbad evaporieren. Rückstand in 30 ul Aceton lösen. 10 ul davon auf die Dünnschichtplatte auftragen (Platte: ITLC-SA Gelman$^{R}$). Die Platte wurde 3 Minuten lang getrocknet. Die Kammer wurde 10 Minuten lang mit Fließmittel äquilibriert, Anschließend mit der Platte nochmals 10 Minuten äquilibriert. (Fließmittel Toluol/Aceton 95 : 5). Nach 25-minütiger Laufzeit Markierung der Umbelliferonorte unter der UV-Lampe. 1 x 1 cm große Chromatogrammflächen wurden ausgeschnitten und in 2 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer extrahiert.

---

x) Die Bestimmung wurde in Zusammenarbeit mit Frl. Schmid, Doktorandin bei Doktor Hoensch, durchgeführt, die den Test erstellte.

(5 Minuten lang am Rotationsschüttler) Zugabe von 5 ml Äther. Nach 5-minütiger Extraktion am Rotationsschüttler und anschließender Zentrifugation wurden 4 ml der Ätherphase in Reagenzgläser überführt und der Äther bei 37°C im Wasserbad evaporiert. Der Rückstand wurde in 1 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer gelöst und im Spektrofluorometer gemessen. (Erregungswellenlänge 338 nm, Emissionswellenlänge 458 nm).

Berechnung der EOD-Aktivität:

Geradengleichung der Standardkurve von Umbelliferon: $y = 0{,}206\ x$

$$\frac{y \times 75}{4 \times 0{,}206 \times t \times \text{mg Prot.}} = \frac{\text{pMol}}{\text{Min.} \times \text{mg Prot.}}$$

y : Meßwerte
t : Inkubationszeit

.6. Präparation von Gewebshomogenaten:

a) Darmmucosahomogenate:

Unter Äthernarkose wurde die Bauchhöhle des Tieres geöffnet und der Dünndarm vom Pylorus ab in einer Länge von 40 cm herausgeschnitten und in eiskalte 0,9%ige Kochsalzlösung gegeben. Nach mehrfachem kräftigen Durchspülen mit eiskalter 0,9%iger Kochsalzlösung wurde der Dünndarm in kleinere Stücke unterteilt, die nochmals kräftig durchspült wurden. Die Dünndarmabschnitte wurden nun auf einer gekühlten Präparierplatte flach ausgebreitet, in Längsrichtung aufgeschnitten und die Mucosa mit einem scharfen Messer abgeschabt. Die abgeschabte Mucosa wurde durch Homogenisation im Glasspotter mit Teflonpistill zu einem 20%igen Homogenat weiterverarbeitet. Die Aufnahme der Mucosa erfolgte in 0,25 M Sucrose oder zur Enzymstabilisierung in einer Lösung aus 0,25 M Sucrose, 20% Glyzerin, 10 mM Tris-HCl pH 7,4.

b) Leberhomogenate:

Unter Äthernarkose wurde die Leber des Versuchstieres freigelegt und nach Eröffnung der Vena cava inferior durch die Vena portae mit 10 ml eiskalter 0,9%iger Kochsalzlösung perfundiert, um die Leber weitgehend blutfrei zu waschen. Danach wurde die Leber aus dem Tier entnommen und in eiskalte 0,9%ige

Kochsalzlösung überführt. Nach Waschen mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurde die Leber mit der Schere zerkleinert und nach Homogenisation in 0,25 M Sucrose ein 20%iges Homogenat hergestellt.

c) Homogenate von Niere, Milz und Lunge:
Unter Äthernarkose wurde die Bauchhöhle des Versuchstieres geöffnet und die Organe herausgeschnitten. Die Organe wurden in eiskalte 0,9%ige Kochsalzlösung überführt. Nach Zerkleinern und Waschen in 0,9%iger Kochsalzlösung wurde in 0,25 M Sucrose ein 20%iges Homogenat hergestellt durch Zerkleinern im Glasspotter mit Teflonpistill.

## 2.7. Mikrosomenpräparation

Mittels Differentialzentrifugation wurden aus den 20%igen Homogenatpräparationen Mikrosomen hergestellt. Es erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 10 000 g, wobei Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien abgetrennt wurden. Das an der Oberfläche schwimmende Fett wurde abgesaugt und der Überstand 45 Minuten lang bei 100 000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Mikrosomenfraktion des Sediments wurde vom glasigen Sediment (Glykogen) abgetrennt und in derjenigen Menge an 0,25 M Sucrose homogenisiert, daß die Proteinkonzentration etwa 20 mg/ml betrug.

## 2.8. Reinigungsmethoden der GT

### 2.8.1. Präparation und Waschen der Mikrosomen

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung dienten die Lebern von jeweils acht mit Methylcholanthren vorbehandelten Ratten. Nach Herstellung eines 20%igen Homogenats, wie oben beschrieben, und 10-minütiger Zentrifugation bei 10 000 g wurden 0,04 ml einer 5%igen Lösung von Di-tert.-butyl-p-Kresol (Verhinderung der Lipidperoxidation als Antioxidans) (35) zugegeben. Danach wurde 45 Minuten lang bei 100 000 g zentrifugiert. Die so hergestellten Mikrosomen wurden zur Waschung in 1,15%iger KCl-Lösung aufgenommen und kurz mit dem Glaspotter homogenisiert. Danach wurde wiederum 45 Minuten bei 100 000 g zentrifugiert. Nach Abtrennen vom Glykogen wurden die Mikrosomen mit 0,25 M Sucrose auf ein Endvolumen von 50 ml gebracht und folgendes Gemisch zugegeben (modifiziert nach 75, 76) (Puffer A):

| | |
|---|---|
| Glycerin | 28 ml |
| 1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,7 | 14 ml |
| 0,1 M Dithioerythritol | 1,4 ml |
| 0,25 M Sucrose | 28,6 ml |
| Gesamtvolumen | 122 ml |

### 2.8.2. Ultraschallbehandlung (75, 76)

Die Enzympräparation wurde unter Eiskühlung in kleinen Fraktionen mit dem Ultrasonic-Gerät (MSE 60 W, Modell 3300) bei etwa 1,5 Amperes in 30-Sekunden-Abschnitten mit jeweils 30 Sekunden Unterbrechung 6 Mal beschallt.

2.8.3. Sobulisieren mit Cholat (75, 76)

Die beschallte Mikrosomensuspension wurde mit 12 ml 10%iger Natriumcholatlösung versetzt und 20 Minuten lang im Eisbad gerührt. Danach wurde 60 Minuten lang die rote durchsichtige Flüssigkeit bei 100 000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand weiterbehandelt.

2.8.4. Ammoniumsulfatfällung

In den Überstand der cholatbehandelten Enzympräparation wurde die gewünschte fein zerriebene Ammoniumsulfatmenge unter laufender Beobachtung des pH-Wertes an einer Glaselektrode langsam eingeführt. Nach Stehenlassen im Eisbad zum quantitativen Ausfällen des Proteins wurde anschließend 20 Minuten lang bei 18 000 g zentrifugiert.

Fällung I : Zugabe von 31,3 g Ammoniumsulfat/100 ml Lösung. Vor Zentrifugation wurde die Lösung 30 Minuten lang im Eisbad stehengelassen.

Fällung II: Zum Überstand der Fällung I wurden weitere 13,7 g Ammoniumsulfat/100 ml Lösung zugegeben. Nach Lösen des Ammoniumsulfats wurde die Enzymlösung zur Vervollständigung der Proteinfällung 10 Stunden bei 4°C stehengelassen.

Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert, durch Filtern von Flüssigkeit abgetrennt und in einem minimalen Volumen eines Puffers folgender Zusammensetzung aufgenommen (Puffer B):

| | |
|---|---|
| Tris-HCl-Puffer pH 7,7 | 0,02 M |
| Glycerin | 10 % |
| Dithioerythritol | $10^{-4}$ M |
| Brij 58 | 0,25 % |

2.8.5. Gelfiltration an einer Bio-Gel$^{R}$-A-1,5m-Säule

Eine Bio-Gel-Säule (100-200 mesh, Dimension 2,5 x 48 cm) wurde mit Puffer B äquilibriert. Das in Puffer B gelöste Protein der Fällung II wurde auf die Säule aufgetragen und ebenfalls mit Puffer B eluiert. Unter Aufzeichnung des Proteinverlaufs (Uvicord) wurden Fraktionen von 3 ml aufgefangen und in jeder zweiten Fraktion Protein und GT-Aktivität (1-Naphthol als Substrat) bestimmt.

2.8.6. Ionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule

Eine berechnete Menge an DEAE-Cellulose wurde in großem Überschuß an Puffer suspendiert. Nach Absetzen wurde der Überstand zur Entfernung feinverteilter Partikel abgesaugt und eine Säule der Dimension 2 x 27 cm hergestellt, die mit Puffer B äquilibriert wurde. Bei der Elution mit einem linearen Gradienten 0-0,5 molar an KCl in Puffer B wurden Fraktionen am Fraktionssammler aufgefangen und von jeder 2. Fraktion Protein und GT-Aktivität (1-Naphthol als Substrat) bestimmt.

2.8.7. Abtrennung des Detergens an einer Bio-Beads$^{R}$-SM-2-Säule mod. nach (57)

10 g Bio-Beads wurden 1 Stunde lang in 100 ml Methanol gerührt, unter Vermeidung von Austrocknung mit 150 ml Methanol schubweise gewaschen und mit 300 ml dest. Wasser nachgewaschen. Bis zur Benutzung wurde das Säulenmaterial in Wasser aufbewahrt.
Eine Säule der Dimension 0,5 x 10 cm wurde hergestellt und zuerst mit dest. Wasser gewaschen. Danach wurde die Säule mit einem Puffer folgender Zusammensetzung äquilibriert (Puffer C):

| | |
|---|---|
| Tris-HCl-Puffer pH 7,7 | 0,02 M |
| Dithioerythritol | 0,1 mM |

Die Probe wurde aufgetragen und mit Puffer C eluiert. Zum Eluat wurde anschließend $MgCl_2$ zugefügt, so daß die Endmolarität 5 mM an $MgCl_2$ betrug.

2.8.8. Affinitätschromatographie an UDP-Hexanolamin-Sepharose 4 B

Aus der von Dr. W. Lilienblum$^{x)}$ nach (1, 14) hergestellten UDP-Hexanolamin-Sepharose 4 B mit etwa 2 uMol UDP-Hexanolamin/ml Säulenmaterial wurde eine Affinitätssäule der Dimension 1,3 x 21 cm hergestellt. Die Säule wurde mit Puffer C äquilibriert, dem 5 mM $MgCl_2$ und 0,06 % Brij 58 zugefügt wurde. Nach Auftrag des Mg-haltigen Eluats der Bio-Beads-Säule wurde mit 50 ml Puffer C mit 5 mM $MgCl_2$ und 0,06 % Brij 58 nachgewaschen. Die Elution des Enzyms von der Affini-

x) Dr. W. Lilienblum: Assistent d. Abteilung f. Biochem. Pharmakologie, Göttingen

tätssäule erfolgte mit 25 ml Puffer C, der kein $MgCl_2$ jedoch 5 mM UDPGA enthielt. Zur vollständigen Elution wurde mit 50 ml Puffer C ohne UDPGA jedoch mit $MgCl_2$ nachgewaschen. Fraktionen von 3 ml wurden aufgefangen. In jeder Fraktion wurde das Protein nach 2.3.b) ermittelt. Zur Bestimmung der Naphtholglucuronidierung wurde im Gegensatz zu 2.4.1. die Enzymreaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet (Enzymprobe enthält UDPGA).

2.9. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach (87)

Geräte: "Polyanalyst" analytischer, temperaturregulierter Elektrophorese-Apparat, Buchler-Instruments

Netzspannungs-Gerät: Buchler Instruments, 0-250 m A stufenlos regulierbar

Gelröhrchen: 120 x 5 mm

Elektrophorese-Lösungen:

| Unterer Gelpuffer | Oberer Gelpuffer |
|---|---|
| 6,15 ml 2N HCl | 10,7 ml 1M $H_2SO_4$ |
| 20,68 g Tris | 2,62 g Tris |
| dest. $H_2O$ ad 100 ml, pH 9,18 | dest. $H_2O$ ad 100 ml. pH 6,14 |

| Unterer Reservoirpuffer | Oberer Reservoirpuffer |
|---|---|
| 51,70 g Tris | 2,47 g Borsäure |
| 15,37 ml 2N HCl | 4,92 g Tris |
| dest. $H_2O$ ad 1000 ml | 1,0 g SDS |
| | dest. $H_2O$ ad 1000 ml |

Untere Gellösung
11,0 g Acrylamid
0,1 g N,N'-Methylenbisacrylamid
dest. $H_2O$ ad 25 ml

Obere Gellösung
3,0 g Acrylamid
0,2 g N,N'-Methylenbisacrylamid
dest. $H_2O$ ad 25 ml

Ammoniumpersulfatlösung:
50 mg Ammoniumpersulfat zu 25 ml dest.$H_2O$
Frisch herstellen.

TMED-Lösung:
120 µl N,N,N,N-Tetramthyläthylendiamin
zu 20 ml dest. $H_2O$. Frisch herstellen.

Polymerisation der Gele:

Trenngel:

Ansatz: 3 ml Untere Gellösung
3 ml Unterer Gelpuffer
3 ml Ammoniumpersulfatlösung
3 ml TMED-Katalysator.

0,8 ml der gut vermischten Lösung wurden in ein einseitig mit Parafilm$^R$ verschlossenes Gelröhrchen gefüllt und mit 25 ul Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde die überstehende Flüssigkeit entfernt.

Sammelgel:

Ansatz: 2,5 ml Obere Gellösung
2,5 ml Oberer Gelpuffer
4,0 ml dest. $H_2O$
1,0 ml Ammoniumpersulfatlösung

Die Geloberfläche wurde mit etwa 1 ml der Sammelgellösung gespült. Anschließend wurden 10 µl TMED auf das Gel gegeben und 0,2 ml der Sammelgellösung. Darauf wurde mit 50 µl dest. $H_2O$ überschichtet. Nach Polymerisation wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen.
Die fertigen Gele wurden mit 5 bis 20 µg Protein beschickt. Dazu wurden 250 µg Protein in 50 µl einer 4%igen SDS-Lösung, 1%ig an $Na_2CO_3$, aufgenommen. Hinzu wurden 5 µl 2-Mercaptoäthanol gegeben. Ein Aliquot dieser Lösung wurde auf die Gele aufgetragen. Bis zum völligen Eindringen der Probe wurde ein Strom von 0,5 mA/Röhrchen, danach einer von 1,5 mA/Röhrchen eingestellt. Der Lauf wurde beendet, sobald der Markerfarbstoff (Bromphenolblau) 1 cm vom unteren Gelende entfernt war.

Coomassie-Blau-Färbung

Ohne Fixierung wurden die Proteinbanden direkt in einer 0,25%igen Lösung von Coomassie Brillant Blau R 250 in 9% Eisessig/45% Methanol gefärbt. Entfärbt wurden die Gele in 5% Methanol/7% Eisessig durch mehrmaliges Wechseln des Entfärbebades.

## 2.10. Bestimmung der Metabolisierung in der isolierten Jejunalschlinge

### 2.10.1. Präparation der Jejunalschlinge

Die Präparation wurde von Winne (129) bzw. Bock und Winne (28) ausführlich beschrieben.

### 2.10.2. Bestimmung der gebildeten Metabolite

Im venösen Blut und im Darminhalt wurde 30 Minuten nach Instillation der zu untersuchenden Substrate die Bestimmung der Metabolite durchgeführt. Je nach Versuchsstellung wurden die Blutfraktionen 10 Minuten bei 5000 g abzentrifugiert und die Plasmafraktionen vorsichtig und quantitativ abzentrifugiert. Die im Darminhalt befindlichen festen Bestandteile wurden durch Homogenisieren zerkleinert. Danach wurden die im folgenden beschriebenen Extraktionsmethoden bzw. enzymatischen Spaltungen an Blut bzw. Plasma und Darminhalt durchgeführt.
Die Mucosa wurde mit Protosol versetzt, bis zur Erzielung einer klaren Lösung verdaut und anschließend gezählt.

## 2.11. Enzymatische Spaltung mit ß-Glucuronidase bzw. Arylsulfatase

1 ml Plasma- bzw. Darminhaltextrakt wurde mit 0,1 ml 1 M Acetatpuffer pH 4,8 versetzt. Zugabe von 2 mg ß-Glucuronidase bzw. 50 µl ß-Glucuronidase/Arylsulfataselösung. Danach wurde mindestens 10 Stunden lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert, bevor zur Bestimmung der Konjugate extrahiert wurde.

Wie durch nochmalige Spaltung und anschließende Extraktion festgestellt wurde, erwies sich die Spaltung als vollständig.

2.12. Bestimmung der Naphthalinmetabolisierung (26, 20)

0,5 ml Blut bzw. Darminhalt wurden zur vollständigen Extraktion 4 Mal mit jeweils 4 ml Äther extrahiert. Dabei gehen Naphthalin und seine Metabolite in die Ätherphase, nicht jedoch die Konjugate. 1 ml Ätherphase wurde in Szintillator gezählt. Zur qualitativen Analyse wurden 3 ml Ätherphase auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und wie unter 2.14 beschrieben, mit Fließmittel A chromatographiert. Aus dem Chromatogramm ließ sich der Anteil an Naphthol im Verhältnis zu Naphthalindihydrodiol ermitteln. Die restliche Ätherphase wurde am Rotationsverdampfer 8-12 Stunden lang verflüchtigt. Wie Vorversuche zeigten, kann dabei Naphthalin zu über 90% entfernt werden (Naphthalin sublimiert stark), während die Hauptmetabolite Naphthol zu 48 % und Naphthalindihydrodiol[x)] zu 100 % im Rückstand verbleiben. Der Rückstand wurde in 0,4 ml Methanol aufgenommen und nochmals gezählt. Aus der Differenz zwischen beiden Zählungen läßt sich der Anteil an nicht umgesetztem Naphthalin bestimmen (der Verlust an Naphthol kann aus dem Dünnschichtchromatogramm zurückgerechnet werden).

Die extrahierten Blut- bzw. Darminhaltfraktionen wurden einer ß-Glucuronidasespaltung unterzogen und zur Bestimmung der Glucuronide nochmals mit Äther extrahiert und ausgezählt.

---

x) $^{14}$C-Naphthalindihydrodiol wurde von G. van Ackeren (111) nach Booth et al. (29) synthetisiert.

## 2.13. Bestimmung der Benzpyrenmetabolisierung

### 2.13.1. Extraktion zur quantitativen Bestimmung der Metabolite

a) Selektive Extraktion von Benzpyren mit Hexan mod. nach (112)

0,5 ml Blut wurden mit 1 ml 1 M KOH/DMSO (15 : 85, v : v) versetzt und zur quantitativen Extraktion 4 Mal mit je 5 ml Hexan extrahiert. Nach Abzentrifugieren wurde jedes Mal 1 ml der Hexanphase ausgezählt. Um sicherzustellen, daß bei der Extraktion ausschließlich Benzpyren erfaßt wird ohne Mitextraktion anderer Komponenten, wurde die Hexanphase eingeengt und wie unter 2.14. beschrieben, dünnschichtanalytisch mit Fließmittel B analysiert. Im Rahmen des Auflösungsvermögens der Dünnschichtplatte und des Dünnschichtscanners konnte nur Benzpyren gefunden werden.

Es wurde außerdem ermitteln, ob und in welchem Maße Tritium des $^{3}$H-Benzpyrens gegen Wasserstoffatome des Extraktionsansatzes ausgetauscht wurde, und damit die Messung verfälscht wurde. Dazu wurden Blut bzw. Darminhalt mit KOH/DMSO versetzt und extrahiert. Nach quantitativem Entfernen der Hexanphase (Verdunsten des Restes, der durch Pipettieren nicht abtrennbar ist) wurde die untere Phase in eine Destillierapparatur überführt und destilliert. Nur etwa 2 % der Radioaktivität

dieser Phase konnten nach Destillation im Destillat gefunden werden trotz Erhitzen beim Destillieren, wobei der Tritiumaustausch ja beschleunigt wird. Der Tritiumaustausch wurde deshalb vernachlässigt.

b) Extraktion zur Bestimmung der Glucuronide mit Äthylacetat nach (110)

1 ml Plasma wurde 3 Mal mit jeweils 8 ml Äthylacetat 30 Minuten lang am Rotationsschüttler bis zur vollständigen Extraktion extrahiert. Nach Abzentrifugieren wurde 1 ml der Äthylacetatphase ausgezählt. Zur Bestimmung der Konjugate wurde die extrahierte Probe wie unter 2.11. einer ß-Glucuronidase-Spaltung unterworfen und nochmals extrahiert. Zur Bestimmung der Restfraktion wurde anschließend ein Aliquot der extrahierten Plamaphase ausgezählt.

2.13.2. Nachweis der Benzpyrenmetabolite mod. nach (45)

2 ml Plasma wurden wie unter 2.11. beschrieben mit ß-Glucuronidase/ Arylsulfatase versetzt und gespalten. Danach wurden 6 ml eines Extraktionsgemisches zugegeben, das aus 5 Teilen gekühltem wassergesättigtem Äthylacetat und 1 Teil gekühltem Aceton bestand. Das Äthylacetat wurde etwa 30 Minuten vor Zugabe von Aceton wassergesättigt. Nach zehnminütigem Schütteln am Rotationsschüttler wurde zentrifugiert und die obere Phase abgehoben. Nach Zugabe einer Spatelspitze Kochsalz wurde die Extraktion noch 3 Mal wie beschrieben durchgeführt.

Die vereinigten organischen Phasen wurden durch Zugabe von Natriumsulfat getrocknet und unter Stickstoffbegasung verdunstet. Der Rückstand wurde nach Verdunsten der Flüssigkeit in Aceton aufgenommen und dünnschichtchromatographisch analysiert.

2.14. Dünnschichtanalytische Bestimmungsmethode der Benzpyren- und Naphthalinmetabolite

Sorptionsmittel:
Kieselgelfertigplatten 60 Merck, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm. Die Platten wurden im Trockenschrank bei 110°C vor Gebrauch eine Stunde aktiviert.
Fließmittel:

A) Benzol/Chloroform/Äthylacetat (1 : 1 : 1) für Naphthalinmetabolite (65)
B) Benzol/Äthanol (19 : 1) für Benzpyrenmetabolite (104)

Zur Bestimmung wurde die Radioaktivitätsverteilung mit dem Dünnschichtscanner (Berthold LB 2723) aufgezeichnet. Der Vorschub und die Dämpfung wurden so eingestellt, daß die aufgezeichneten Peaks maximal 2 mm in Vorschubrichtung verschoben waren.

2.15. Bestimmung der Radioaktivität

Die Zählung der Radioaktivität erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler. Bei sämtlichen Proben wurde eine Quenchkorrektur durch Zugabe von internem Standard durchgeführt. Nach erstmaligem Auszählen wurden anschließend möglichst geringe Volumina der entsprechenden radioaktiven Standard-

lösungen zugegeben und die Proben nochmals gezählt.
Blut wurde vor Zählung 1 : 20 mit dest. Wasser verdünnt und homogenisiert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Reinigung der GT mit 1-Naphthol als Substrat

Die entwickelte Reinigungsmethode baut auf den in meiner Diplomarbeit erarbeiteten Ergebnissen und auf den Resultaten anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe auf. Wie in der Einleitung erläutert, wird durch Vorbehandlung von Ratten mit Phenobarbital die Glucuronidierung von Morphin, durch Vorbehandlung mit Methylcholanthren die Glucuronidierung von Naphthol gesteigert. In vorangehenden Versuchen von Dr. D. Josting, ausgehend von Phenobarbital-vorbehandelten Ratten, konnte durch Chromatographie an DEAE-Cellulose von der Naphthol-GT eine Enzymfraktion abgetrennt werden, die Morphin aber nicht Naphthol glucuronidiert (22).

Nach Methylcholanthren-Vorbehandlung ist die Naphthol-GT in der spezifischen Aktivität 3-fach erhöht, die Morphin-GT sehr gering.

Zur Reinigung der Naphthol-GT wurde deshalb von Methylcholanthren-Mikrosomen ausgegangen.

Die einzelnen Reinigungsschritte und die erreichten spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die beschriebene Reinigungsmethode geht aus von der von Lu et al. (75, 76) für die Reinigung der Cytochrome P 450 entwickelten Methode.

Tabelle 1:

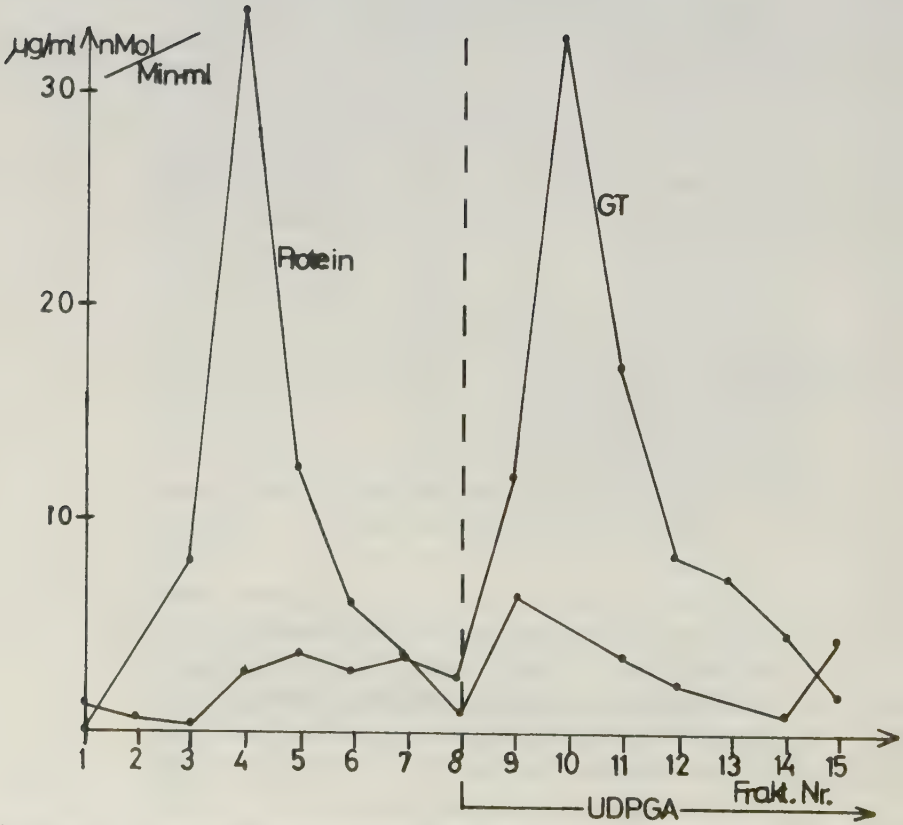
Reinigung der GT der Leber (1-Naphthol als Substrat) von Methylcholanthren-vorbehandelten Ratten

| Reinigungsschritt | GT nMol / Min. x mg Prot. |
|---|---|
| Homogenat | 38 (2,5)x) |
| Mikrosomen | 218 (7,8)x) |
| Ammoniumsulfatfällung | 495 |
| Bio-Gel-A-1,5m | 918 |
| DEAE-Cellulose | 1263 |
| UDP-Hexanolamin-Sepharose 4 B | 4724 |

x) Zahlen in Klammern: Messung im nativen Zustand

Das mikrosomale Enzym wird in Gegenwart von Glycerin mit Natriumcholat solubilisiert. Die solubilisierten Proteine werden mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Im Proteinpräzipitat bei 40 bis 50 % Sättigung an Ammoniumsulfat findet sich vorwiegend Cytochrom P 450, bei höherer Ammoniumsulfatkonzentration die GT.

Durch Gelausschluß an Bio-Gel A-1,5 m wird ebenfalls Fremdprotein (Cytochrom P 450) und Cholat abgetrennt. Außerdem wird das Enzym mit einem nichtionischen Detergens Brij 58 äquilibriert.




bbildung 5: Chromatographie der Naphthol-GT an UDP-Hexanolamin-Sepharose-4 B. Fraktionen etwa 3 ml. Auftragung des an der Bio-Beads-Säule von Detergens befreiten Enzyms $(700 \frac{\mu Mol}{Min})$

Dieses Detergens, ein Äther von Hexadecylalkol mit Polyoxyäthylen (20 Mol) ähnlich wie Lubrol WX führt bei ausreichender Solubilisierung zu einer geringeren Hemmung der Enzymaktivität als andere Detergentien wie z.B. Emulgen 911. Die anschließende DEAE-Cellulose-Säule ermöglicht, wie oben geschildert, nach Phenobarbitalbehandlung die Auftrennung in verschiedene Enzymformen. In der vorangehenden Diplomarbeit erfolgte durch isoelektrische Fokussierung des partiell gereinigten Enzyms eine nur unvollständige Abtrennung einer Bande mit einem Molekulargewicht von 48 000 Dalton. Auch durch Chromatographie an CM-Cellulose und Hydroxlapatit sowie durch hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose$^{R}$ (H. Ottenwälder, unveröffentlichte Versuche) konnte diese Bande nicht entfernt werden. Erst die Entwicklung einer Affinitätschromatographie mit UDP-Hexanolamin-Sepharose ermöglichte die Abtrennung der Bande bei 48 000 Dalton.

Wie die Abbildung zeigt, ermöglicht diese Affinitätschromatographie eine starke Abtrennung von Fremdprotein. 80 % der insgesamt wiedergefundenen Enzymeinheiten erscheinen nach Elution mit Puffer C mit 5 mM UDPGA (jedoch ohne $MgCl_2$) in den Fraktionen 9 bis 13.

Von der Fraktion der UDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule mit der höchsten spezifischen Aktivität wurde anschließend eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach 2.9. durchgeführt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts dienten Marker-

proteine (Katalase: Molekulargewicht 58 000 Dalton, Ovalbumin: Molekulargewicht 43 000 Dalton). Die folgende Abbildung zeigt eine photographische Aufnahme der Gele.

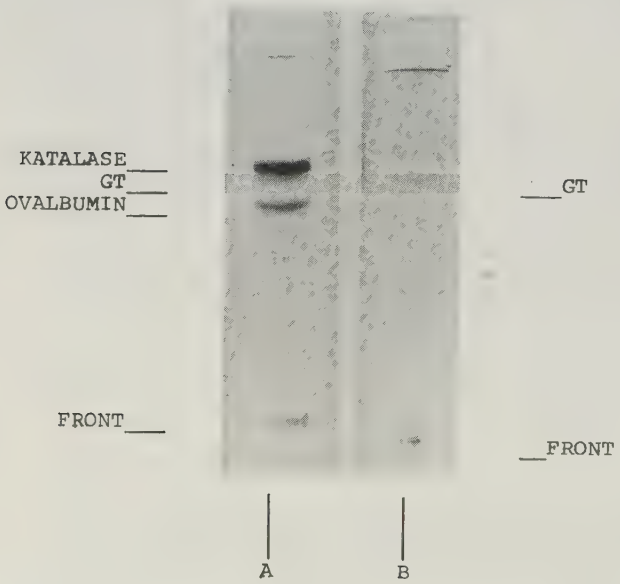



Abbildung 6: Photographische Aufnahme von Gelen (A: GT mit Markern, B: GT ohne Marker)

Wie die Abbildung zeigt, liegt die Bande der GT deutlich unter der von Katalase. Durch Auftragung im halblogarithmischen Maßstab (Ordinate: Molekulargewichte in logarithmischem Maßstab, Abszisse: Laufstrecke der Proteinfront in linearem Maßstab) konnte das Molekulargewicht der GT zu 54 000 Dalton bestimmt werden.

3.2. Vergleich der Hin- und Rückreaktion der Naphtholglucuronidierung im partiell gereinigten Enzym (DEAE-Cellulose-Stufe) mit dem membrangebundenen Enzym

Die Rückreaktion der Naphtholglucuronidierung gemessen als UDP-abhängige Bildung von Naphthol aus Naphtholglucuronid (nach vollständiger Hemmung der ß-Glucuronidase durch Saccharolacton) bildet eine besonders interessante Eigenschaft der GT, da sie im Gegensatz zur Hinreaktion ausschließlich wasserlösliche Substrate, Naphtholglucuronid und UDP, benutzt. Das Verhältnis von Hin- zu Rückreaktion des solubilisierten Enzyms ist deshalb besonders im Vergleich mit dem membrangebundenen Enzym interessant.

a) Zeitlicher Verlauf der Reaktion

Wie Bock und White (17) gezeigt haben, ist die Rückreaktion durch Detergentien aktivierbar. Wie Abbildung 7 zeigt, läßt sich auch im teilweise gereinigten Präparat der DEAE-Cullulose-Stufe die Rückreaktion nachweisen. Die Rückreaktion erweist sich unter Hemmung der ß-Glucuronidase durch 5 mM Saccharolacton für die Fraktion der DEAE-Cellulose-Säule bis 4 Minuten als linear. Für Mikrosomen bleibt jedoch die Linearität nicht so lange erhalten.

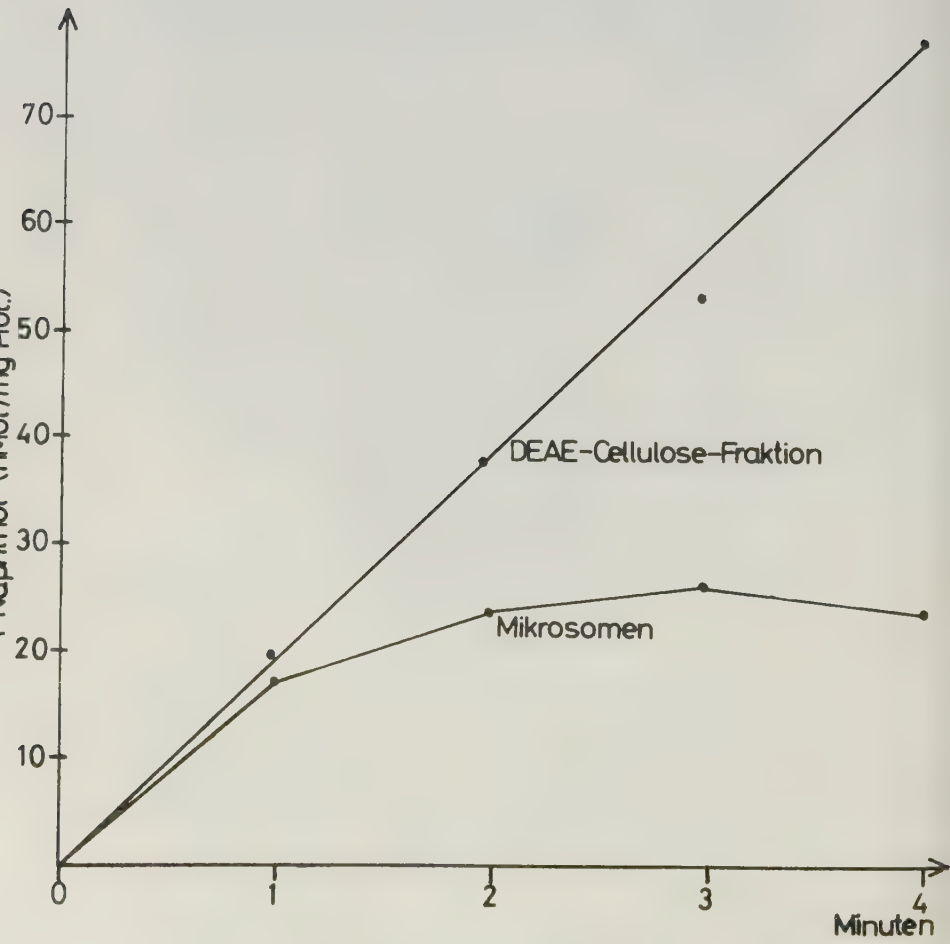



Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Rückreaktion in Mikrosomen (Aktivierung mit 0,05 % Brij 58) und einer Fraktion der DEAE-Cellulose-Säule.

b) Substratabhängigkeit der Reaktion

Für die Vorwärtsreaktion wurde die Substratabhängigkeit der Glucuronidierung für Mikrosomen und Fraktionen der DEAE-Cellulose-Säule bereits in der Diplomarbeit bestimmt.

Nach Auftragung nach Lineweaver-Burke ergaben sich für das partiell gereinigte Enzym bezüglich der Rückreaktion folgende Diagramme:

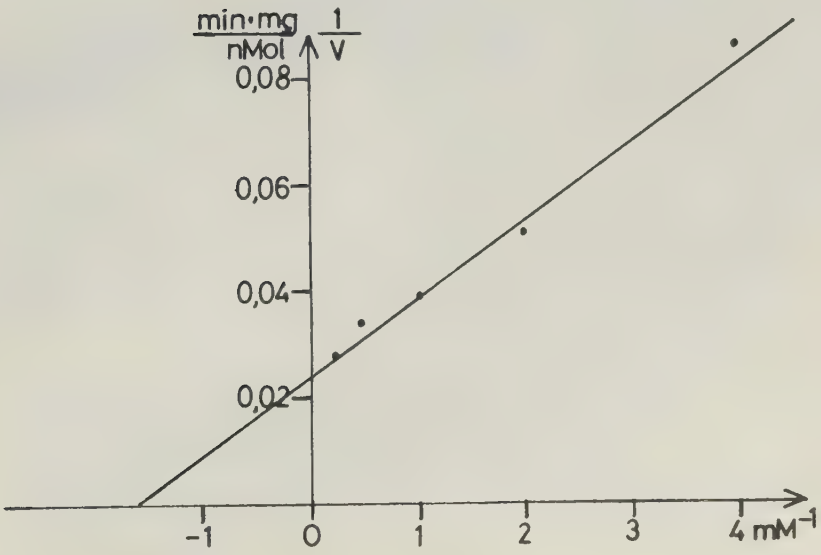



Abbildung 8: Lineweaver-Burk-Auftragung für Naphthol-glucuronid der DEAE-Cellulose-Fraktion.

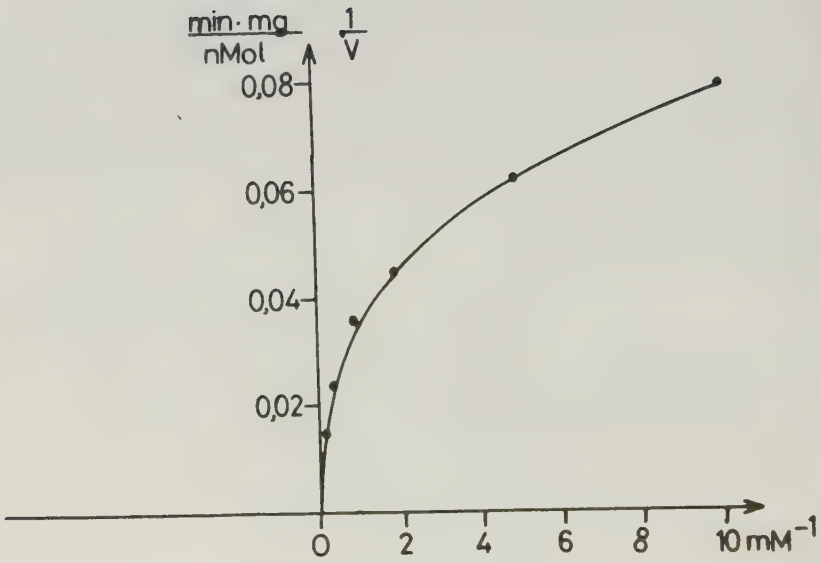



Abbildung 9: Lineweaver-Burk-Auftragung für UDP der DEAE-Cellulose-Fraktion

Wie Abbildung 9 zeigt, ergibt die Auftragung nach Lineweaver-Burk keine Gerade. Der Grund für diese Abweichung konnte nicht ermittelt werden. Deshalb konnte ein $K_M$-Wert nicht angegeben werden.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die an Mikrosomen und partiell gereinigten Fraktionen (DEAE-Cellulose-Stufe) ermittelten kinetischen Parameter (apparente $K_M$-Werte):

Tabelle 2: Vergleich der kinetischen Parameter der mikrosomalen und teilweise gereinigten GT (DEAE-Cellulose-Schritt)

| Enzympräparation | | $K_M$-Werte (mM) 1-Naphthol | Naphtholglucuronid |
|---|---|---|---|
| Mikrosomen | nativ | 0,009 | ---- |
| | aktiviert (0,05% Brij 58) | 0,06 | 0,26 |
| partiell gereinigtes Enzym | | 0,17 | 0,62 |

Wie Tabelle 2 zeigt, nimmt der $K_M$-Wert für 1-Naphthol in Mikrosomen nach Aktivierung stark zu. Im Verlauf der Reinigung bis zur DEAE-Cellulose-Stufe ist ebenfalls eine Zunahme des $K_M$-Wertes sowohl für 1-Naphthol als auch für Naphtholglucuronid feststellbar.

Bildet man das Verhältnis Hin/Rückreaktion für Sättigungsbedingungen (3 mM UDP; 0,5 mM Naphthol; 10 mM Naphtholglucuronid) nach 1-minütiger Inkubation, so können für das Enzym folgende Faktoren angegeben werden:

Tabelle 3: Verhältnis der Hin-/Rückreaktion der mikrosomalen und teilweise gereinigten GT

| Enzympräparation | Naphthol-GT $V_{vorwärts}/V_{rückwärts}$ |
|---|---|
| Mikrosomen | 24,9 ± 4,0 (8) |
| partiell gereinigtes Enzym | 14,7 ± 3,4 (14) |

Mittelwerte und Standardabweichung der in Klammern angegebenen Anzahl an Versuchen.

Wie sich zeigt, ist die Rückreaktion auch im solubilisierten und teilgereinigten Enzym nachweisbar. Im Vergleich zum membrangebundenen Enzym erweist sich die Rückreaktion als beschleunigt (Tabelle 3).

## 3.3. Bestimmung der Glucuronidierung in verschiedenen Geweben

Um die Existenz und die Substratspezifität der GT in den extrahepatischen Geweben zu bestimmen, wurden Homogenate und Mikrosomen verschiedener Gewebe auf ihre GT-Aktivität für die Substrate 1-Naphthol, Morphin und Bilirubin untersucht (Tabelle 4). Zur Untersuchung der Substratspezifität der GT in den einzelnen Geweben sind Mikrosomen bzw. gereinigte Enzyme besonders geeignet. Mikrosomen aus verschiedenen Geweben sind jedoch nicht vergleichbar. Besonders die Mikrosomenfraktion extrahepatischer Gewebe enthält in wechselndem Umfang Verunreinigungen anderer Organellen z.B. der Plasmamembran. Außerdem sind die Ausbeuten unterschiedlich. Deshalb wurde besonders auf die Bestimmung der Enzyme im Organhomogeat Wert gelegt. Da in einigen Organen eine hohe ß-Glucuronidaseaktivität anzutreffen ist, die manchmal sogar die GT-Aktivität beträchtlich übersteigt (2, 105), wurden die Bestimmungen unter Zugabe von Saccharolacton, einem Hemmer der ß-Glucuronidase (72) durchgeführt.

Tabelle 4 a): GT-Aktivität in der Mikrosomenfraktion verschiedener Gewebe (Messung im aktivierten Zustand)

| Gewebe | GT (nMol/Min. x mg Prot.) | | |
|---|---|---|---|
| | 1-Naphthol | Morphin | Bilirubin |
| Leber | 67 | 6,3 | 0,64 |
| Niere | 19 | 0,15 | 0,16 |
| Darm | 3,0 | 0,1 | 0,2 |
| Milz | 1,7 | <0,1 | <0,1 |
| Lunge | 5,4 | <0,1 | <0,1 |

Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Tabelle 4 b): GT-Aktivität in Homogenaten verschiedener Gewebe
(Messung im aktivierten Zustand)

| Gewebe (Organgewicht / 200 g Ratte) | GT nMol / Min. x g Gewebe | | |
|---|---|---|---|
| | 1-Naphthol | Morphin | Bilirubin |
| Leber (8 g/200 g) | 2397 ± 87<br>( 111 ± 4)x) | 443 ± 45 | 29 ± 2,4 |
| Niere (1,75 g/200 g) | 798 ± 11<br>( 73 ± 2)x) | 2,4 ± 1,0 | 9,3 ± 3,0 |
| Darm xx) | 433 ± 21<br>(209 ± 19)x) | 13 ± 3,9 | 2,7 ± 0,6 |
| Milz (0,434 g/200 g) | 142 ± 6<br>( 41 ± 7)x) | 0,0 | 0,0 |
| Lunge (1,58g/200g) | 100 ± 17<br>( 30 ± 3)x) | 0,0 | 0,0 |

x) Zahlen in Klammern (Naphthol-GT) Messung im nativen Zustand

xx) Duodenum u. Dünndarm (0-40 cm vom Pylorus) Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 Versuchen

GT-Aktivität für 1-Naphthol als Substrat konnte in allen 5 untersuchten Geweben ermittelt werden. Die GT-Aktivität für Morphin konnte mit Sicherheit für die Leber, die Niere und den Darm festgestellt werden. In Milz und Lunge war eine Messung der Glucuronidierung unter den Testbedingungen nicht nachweisbar. Bilirubinglucuronidierung ließ sich in Leber, Niere und Darm nachweisen, nicht jedoch in Milz und Lunge. Bei Messung im Homogenat ließ sich zwar ein Farbstoff messen. Nach Aufnahme eines Spektrums war der Farbstoff jedoch nicht mit dem aus Bilirubinmonoglucuronid entstehenden Azodipyrrol identisch. Um festzustellen, ob dieses Spektrum durch Überlagerung verschiedener Farbstoffe zustande kommt, wurde verschiedene Zeiten lang die Glucuronidierungsreaktion inkubiert und dann das Spektrum aufgenommen. Im Rahmen der Meßgenauigkeit wurde keine Änderung des Spektrums beobachtet.

Die Messung der Glucuronidierung an Gewebshomogenaten ermöglicht außerdem eine leichte Umrechnung auf das Gesamtgewebe. Damit läßt sich das folgende Schaubild der Glucuronidierung im Organismus erstellen.

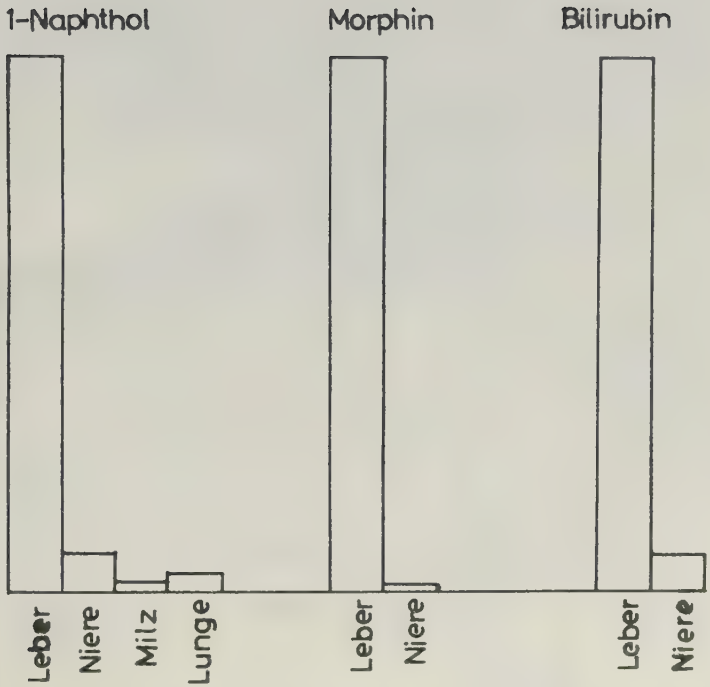



Abbildung 10: GT-Aktivität für verschiedene Substrate im Gesamtorgan (Aktivierter Zustand)

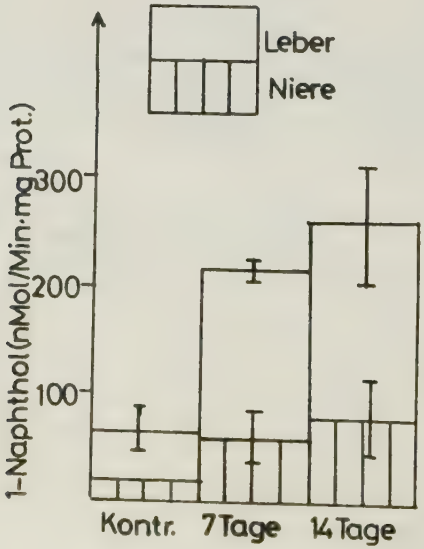
3.3.1. Langzeitinduktion der GT in verschiedenen Geweben durch Aroclor 1254

Ein Fehlen der Glucuronidierung von Morphin und Bilirubin in Lunge und Milz könnte durch die mangelnde Sensibilität der Tests vorgetäuscht werden. Deshalb wurde versucht, die GT in verschiedenen Organen zu induzieren. Aroclor 1254 eignet sich besonders gut als Induktorstoff, weil das Substanzgemisch sowohl die GT für 1-Naphthol als auch für Morphin induziert (21,7). Wegen seiner langen Verweildauer im Organismus und guten Penetration erreicht es fast jedes Gewebe.

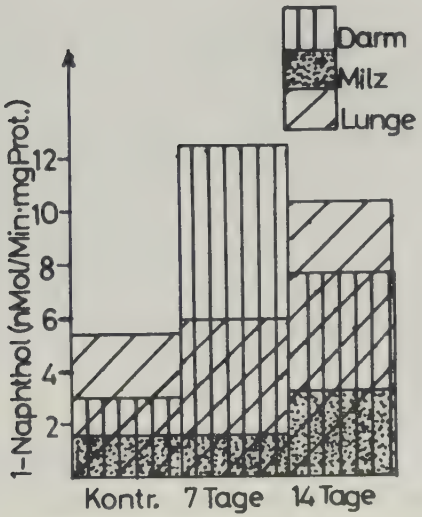
Es wurde eine hohe Dosis (500 mg/kg intraperitoneal als 50 %ige Lösung in Olivenöl) verwendet.

Abbildung 11: Induktion der GT durch Aroclor 1254 in verschiedenen Geweben

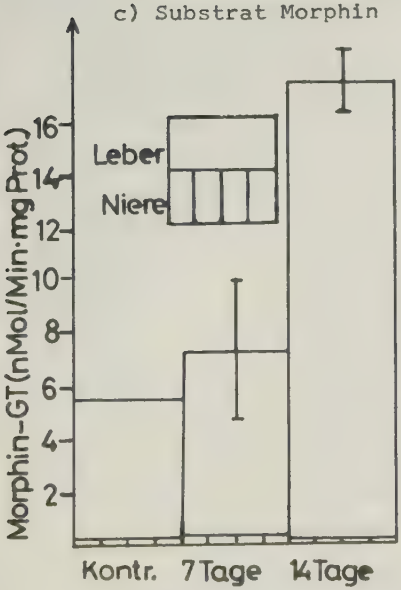
a) Substrat Naphthol in Leber und Niere



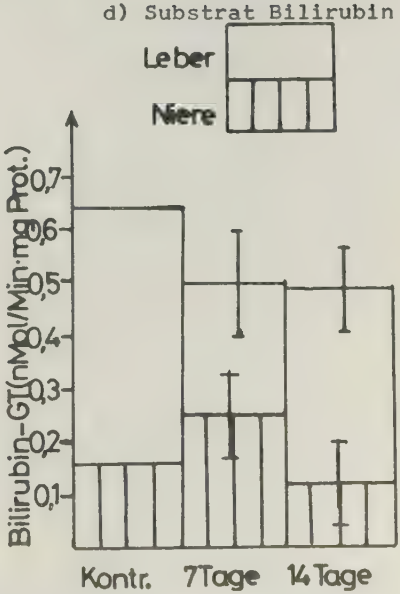
b) Substrat Naphthol in Darm, Milz, Lunge




c) Substrat Morphin




d) Substrat Bilirubin




Mittelwerte aus 3 bzw. 4 Bestimmungen. Bei 4 Bestimmungen Standardabweichung eingezeichnet.

Trotz Induktion konnte unter denselben Testbedingungen wie bei der Messung im nichtinduzierten Zustand für die Substrate Morphin und Bilirubin in den Organen Milz und Lunge keine Aktivität mit Eindeutigkeit gemessen werden.

Wie sich aus den Abbildungen ergibt, ist die Naphthol-GT in allen Geweben induzierbar. Auch die Morphin-GT der Leber scheint induzierbar zu sein. Wegen der geringen Aktivität der Morphin- und Bilirubin-GT in Niere und Darm ließ sich eine Induktion in diesen Geweben nicht eindeutig nachweisen.

### 3.3.2. Orale Induktion der GT im Darm durch Aroclor 1254

Werden Fremdstoffe durch die Nahrung zugeführt, so bilden die Zellen der Darmmucosa die erste Möglichkeit zur Metabolisierung. Es ist deshalb wichtig zu erfahren, in wieweit die Darmmusoca in der Lage ist, Fremdstoffe zu metabolisieren, bevor sie in die Blutbahn gelangen und zur Leber weitertransportiert werden. Es wurde deshalb die Induktion der Naphthol-GT nach oraler Gabe von Aroclor 1254 untersucht. Die Aktivität wurde sowohl in Mikrosomen als auch im Mucosahomogenat bestimmt. Die Bestimmung der Enzyme im Homogenat ergibt verläßlichere Werte über das Ausmaß der Induktion, da bei einer Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums ohne Änderung der Proteinzusammensetzung eine Induktion bei der Bestimmung der mikrosomalen Aktivität übersehen würde.

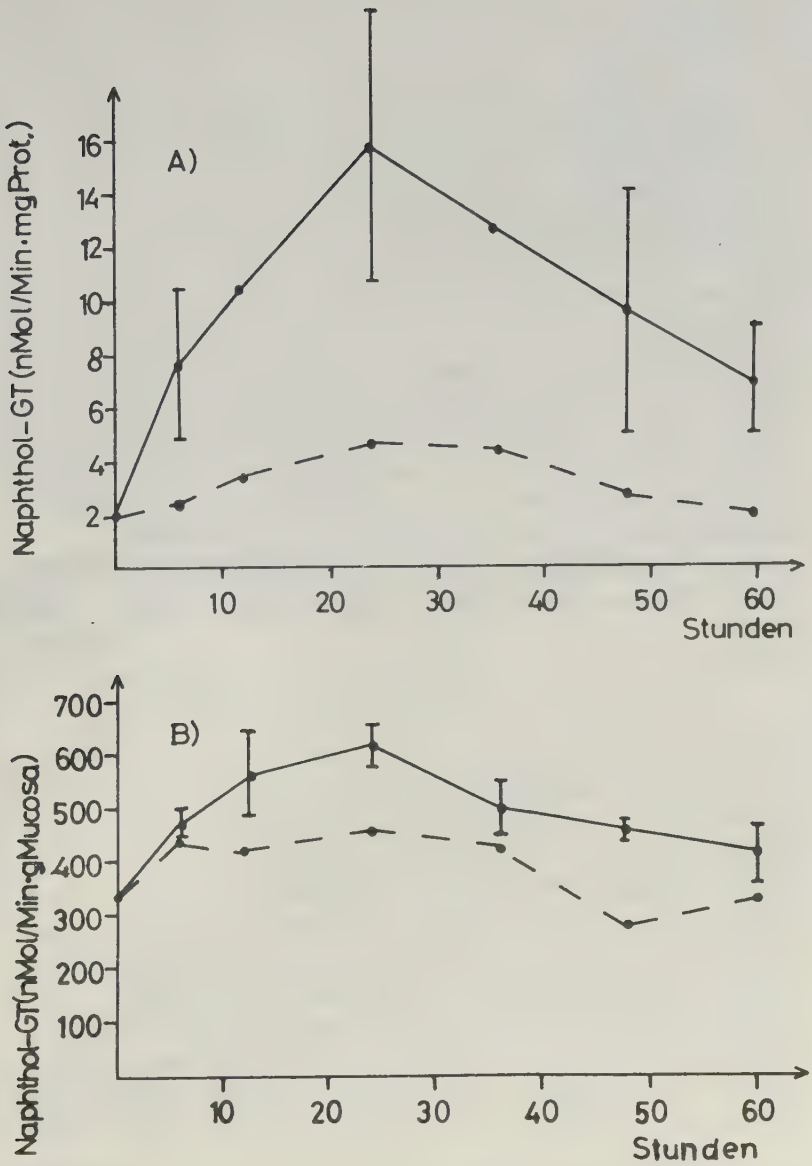



Abbildung 12: Zeitabhängigkeit der GT-Aktivität in Mikrosomen (A) bzw. Homogenat (B) des Rattendünndarms. Mittelwert aus 4 Experimenten. Applikation von Olivenöl (----1 ml/kg) bzw. Aroclor 1254 (----1 ml/kg 8 %ig in Olivenöl), Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten

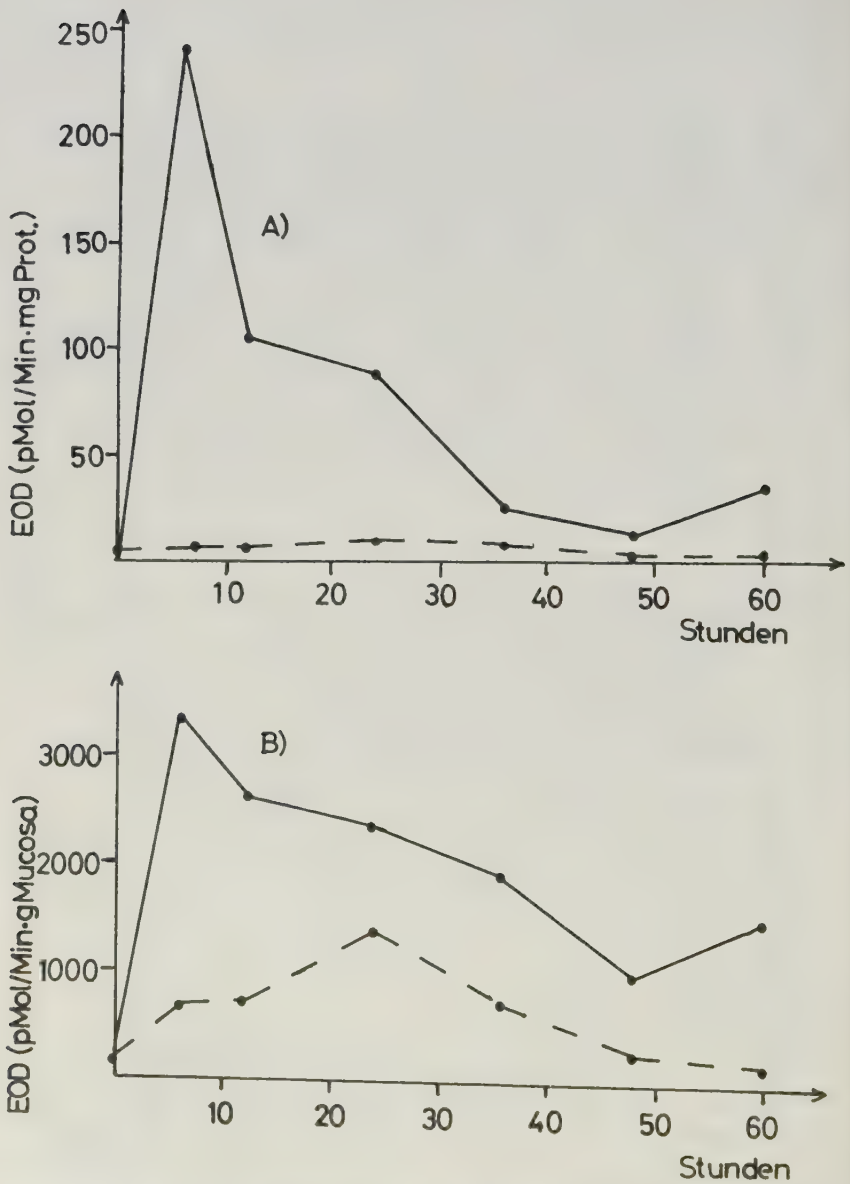



Abbildung 13: Zeitabhängigkeit der Monooxygenasereaktion (Ethoxycumarin als Substrat) in Mikrosomen (A) bzw. Homogenat (B) des Rattendünndarms. Applikation von Olivenöl (----1 ml/kg) bzw. Aroclor 1254 (----1 ml/kg 8 %ig in Olivenöl)

Um die Metabolisierung durch die Phase-I-Reaktion mitzuerfassen, wurde die Aktivität von Cytochrom P 450 für das Substrat Ethoxycumarin (EOD) mitbestimmt. Ethoxycumarin wird nicht nur von einer Form der Monooxygenase umgesetzt (109) und eignet sich deshalb besonders, um eine generelle Induktion der Monooxygenase(n) zu untersuchen. Wie die Abbildungen zeigen, wird die höchste spezifische Aktivität der GT später erreicht als die der EOD. Eine Dosissteigerung von Aroclor 1254 auf 160 mg/kg bewirkt bei der EOD (nach 24 Stunden) eine Steigerung der spezifischen Aktivität auf das 6-fache. Unter diesen Bedingungen konnte die GT-Aktivität (24-Stunden-Wert) nicht gesteigert werden, sie war sogar etwas vermindert.

## 3.4. Metabolismus von Naphthalin und Benzpyren in der isolierten Jejunalschlinge

Studien an Zellfraktionen und in Zellhomogenaten ergeben unerläßliche Informationen, um Experimente an komplizierteren Systemen, wie isolierten Zellen, perfundierten Organen oder am Ganztier analysieren zu können. Der Metabolismus im intakten Organ hängt außer von der Enzymmenge, die oben bestimmt wurde, von einer Reihe weiterer Faktoren ab (Konzentration der Substrate am aktiven Zentrum, intrazelluläre Kontrolle der Enzymaktivität, paralleler Metabolismus durch verschiedene Abbauwege usw.). Für toxikologische Fragestellungen ist das Verhältnis von oxidierenden und konjugierenden Enzymen für die Kumulation reaktiver Intermediärprodukte entscheidend.

Der Fremdstoffmetabolismus im intakten Organ sollte am Beispiel der isolierten, geschlossenen Jejunalschlinge (28, 124) untersucht werden.

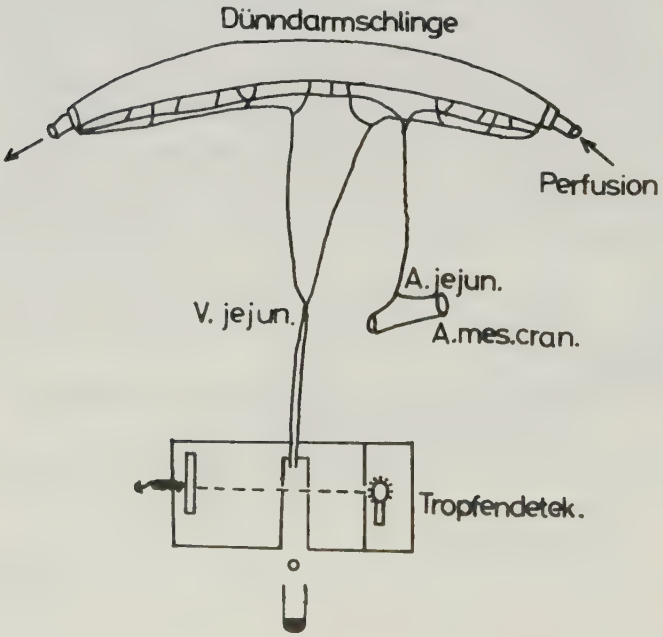



Abbildung 14: Schematische Darstellung einer isolierten Jejunalschlinge (Winne, 1966)

Der Blutabfluß erfolgte ausschließlich durch die Vena jejunalis der isolierten Darmschlinge. Dadurch war eine exakte Bilanzierung der Substrate und der gebildeten Metabolite möglich.

In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, daß 1-Naphthol und Morphin rasch durch die Darmmucosa metabolisiert werden (67). Außerdem konnte in Studien des Naphthalinmetabolismus mit isolierten Leberzellen gezeigt werden, daß die Glucuronidierung ein wichtiger Schritt zur Inaktivierung des toxischen Dihydrodiols ist (26). Auch beim Metabolismus des Benzpyrens scheint der Glucuronidierung eine große Bedeutung bei der Entgiftung der toxischen Phenole zuzukommen(60).

Für den Metabolismus des Naphthalin kann folgendes allgemeine Schema angegeben werden (30, 113):

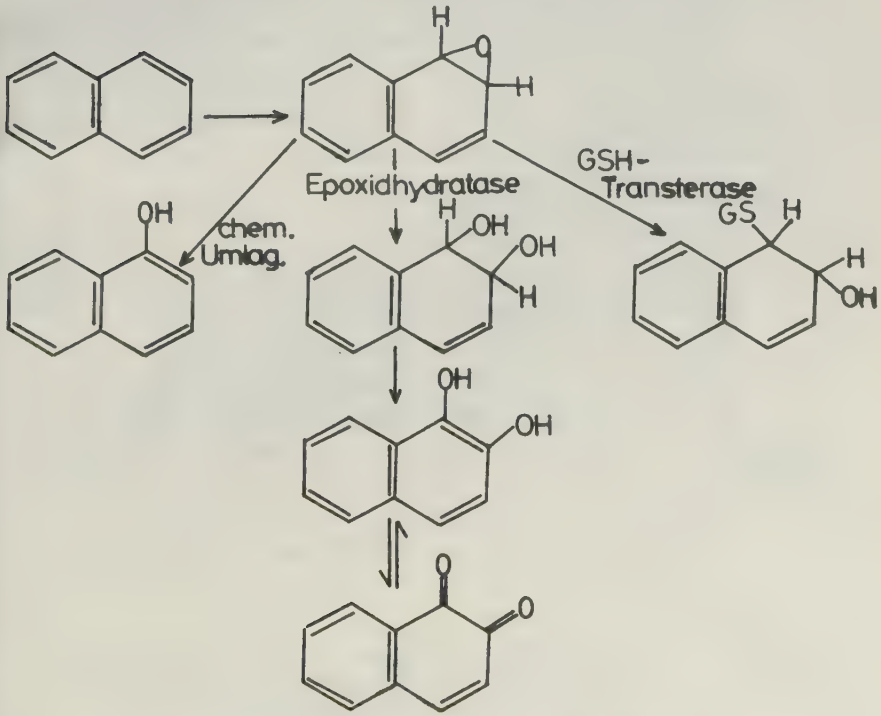



Abbildung 15: Metabolismus des Naphthalins

Naphthalin wird zunächst durch die Monooxygenase in das reaktive Epoxid überführt. Dieses kann durch die Epoxidhydratase in das Dihydrodiol, durch die Glutathiontransferase in das GSH-Konjugat oder nichtenzymatisch im wesentlichen in 1-Naphthol umgewandelt werden. Das Dihydrodiol kann durch Dehydrogenasereaktion in das Catechol überführt werden, das nichtenzymatisch rasch in das O-Chinon übergehen kann.

Zur Untersuchung des Naphthalinmetabolismus wurden 100 nMol $^{14}$C-Naphthalin in 20 µl äthanolischer Lösung in die isolierte Darmschlinge eingebracht und die Produkte nach 30 Minuten untersucht. Die dünnschichtchromatographische Analyse ergab folgendes Bild:

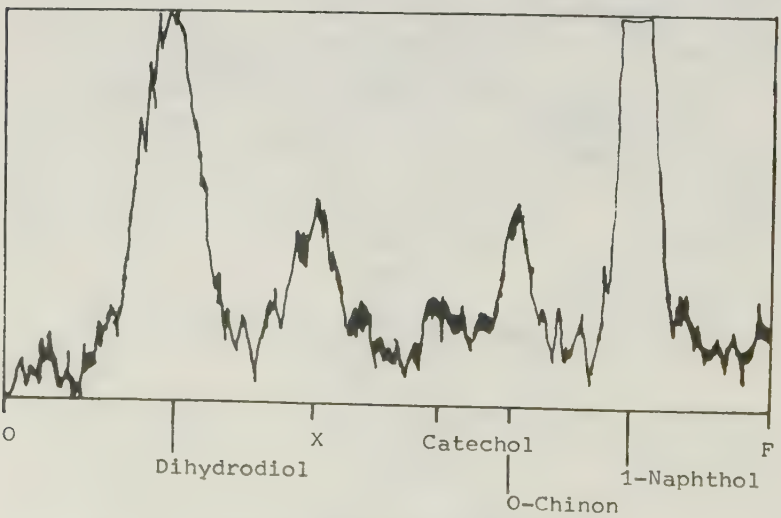



Abbildung 16: Naphthalinmetabolismus in der isoliert perfundierten Jejunalschlinge (Metabolite im Portalplasma ohne Konjugate) Wegen seiner starken Flüchtigkeit erscheint Naphthalin nicht auf dem Chromatogramm

Wie die Abbildung zeigt, werden als hauptsächliche Metabolite 1-Naphthol und das Dihydrodiol gebildet.

Die folgende Tabelle zeigt den Anteil an Naphthalin und seinen Metaboliten in den Fraktionen.

Tabelle 5: Aufnahme und Metabolismus von Naphthalin durch die isolierte Jejunalschlinge

| Fraktion | Bilanz von $^{14}$C-Naphthalin und seinen Metaboliten 30 Minuten nach Instillation | |
|---|---|---|
| | Darminhalt | Portalblut |
| | (% der Dosis = 100 nMol) | |
| Naphthalin | 1 (0-2) | 84 (79-89) |
| Metabolite (einschließlich Konjugate) | 3 (2-4) | 13 (11-15) |

Mittelwerte und Fehlergrenzen aus 3 Experimenten.

Wie die Tabelle zeigt, erscheint ein großer Anteil des Naphthalins unmetabolisiert im Blut. Spaltet man das Blut nach Extraktion mit Äther mit ß-Glucuronidase und extrahiert anschließend nochmals, so gibt die Radioaktivität im Ätherextrakt den Anteil der Glucuronide an. Bezogen auf die Gesamtradioaktivität können etwa 5 % Glucuronide ermittelt werden, d.h. etwa 40 % der Metabolite des Portalbluts sind Glucuronide.

Naphthalin wird vielfach als Modellsubstanz für carcinogene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe verwendet. Es ist deshalb wichtig zu erfahren, in wie weit die Ergebnisse an Naphthalin auf andere Stoffe, wie z.B. Benzpyren übertragbar sind. Der Metabolismus des Benzpyrens läßt sich wie folgt darstellen (44).

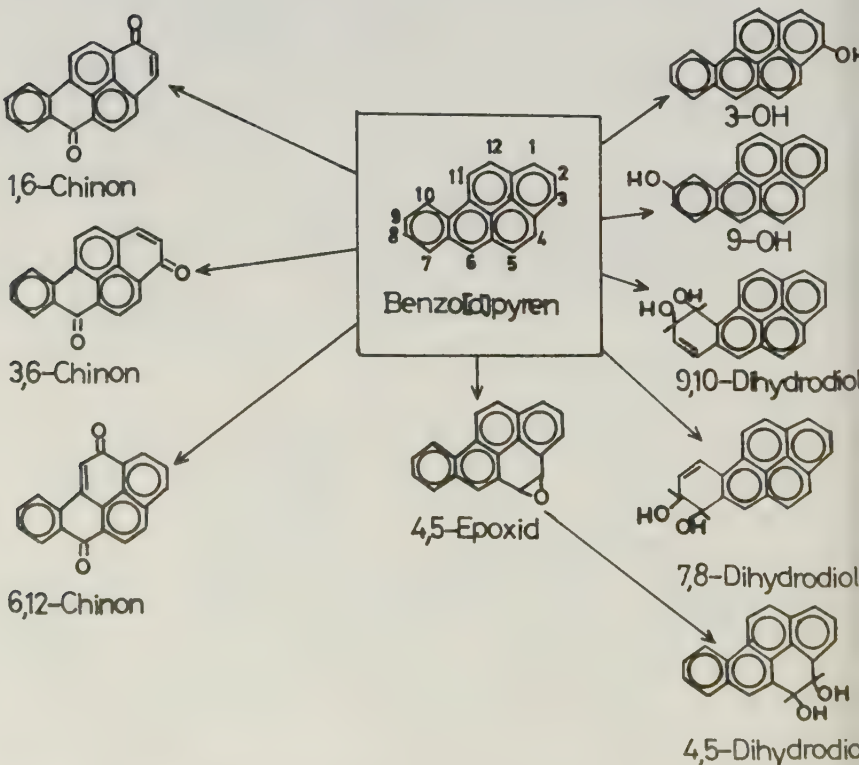



Abbildung 17: Benzo(a)pyren und seine Primärmetabolite. Die in der Abbildung gezeigten Primärmetabolite werden sekundär enzymatisch oder nichtenzymatisch weiterverändert.

Das Studium der Resorption und des Metabolismus von Benzpyren wurde durch Verwendung einer Methode ermöglicht, die es gestattet, selektiv Benzpyren mit minimaler Kontamination an Metaboliten zu extrahieren, was durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie nachgewiesen wurde (112). Da ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph nicht zur Verfügung stand, konnte eine Überprüfung der Methode nur durch Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden. Dabei war eine Identifikation einzelner Metabolite nicht möglich. Für die Fragestellung stand jedoch im Vordergrund, welcher Anteil des Benzpyrens bereits in der Darmwand metabolisiert wird, unabhängig von der Identifikation einzelner Metabolite.

Benzpyren wurde vor Applikation nach (39) gereinigt. 5 µl (100 nMol) Benzpyren in Aceton wurden in den Darm eingegeben. Bei dieser Applikation könnte möglicherweise das Benzpyren aggregieren oder nur an der Injektionsstelle resorbiert werden und ein Ergebnis liefern, das einem In-vivo-System mit gleichförmiger Benzpyrenverteilung nicht entspricht. Deshalb wurde das Benzpyren auch in 50 µl Olivenöl gelöst und mit 450 µl 0,9 % NaCl-Lösung vermischt. Nach Beschallen wurde eine Ölsuspension erhalten, die in das Darmlumen injiziert wurde. Durch diese Applikationsmethode wurde ein ähnliches Ergebnis wie bei Instillation von Aceton erreicht. Anscheinend wird im System eine ausreichende Verteilung des Benzpyrens erreicht.

Da bei Extraktion nach 2.13.2. aus Gesamtblut gelbe Farbstoffe mitextrahiert wurden, die die chromatographische Analyse beeinflussen können, wurde Plasma extrahiert und durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Da Benzpyrenmetabolite in Reinsubstanz nicht zur Verfügung standen, wurden zum Vergleich die bei In-vitro-Inkubation von Lebermikrosomen entstehenden Metabolite mitchromatographiert (39). Es wurden Mikrosomen von methylcholanthrenvorbehandelten Tieren verwendet. Die Metabolite wurden mit Athylacetat extrahiert.

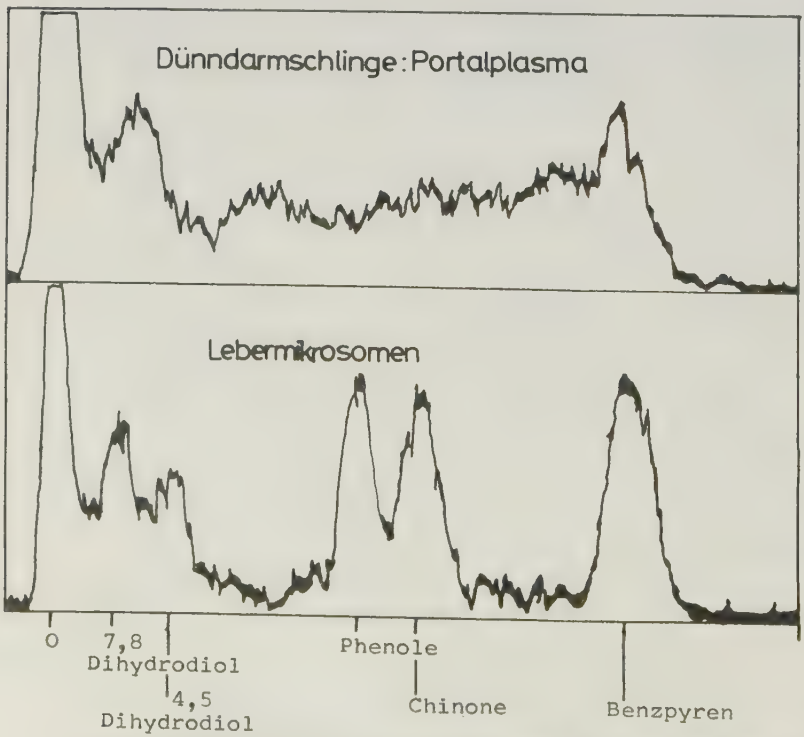



Abbildung 18: Benzpyrenmetabolismus in der isoliert perfundierten Jejunalschlinge (Metabolite im Portalplasma nach Glucuronidasespaltung)

Die dünnschichtchromatographische Analyse des Plasmas zeigt eine starke Metabolisierung. Eine Auftrennung in scharfe Maxima wie bei Lebermikrosomen war trotz empfindlicher Einstellung des Dünnschichtscanners nicht möglich.

Durch Extraktion nach 2.13.1.a) war es möglich, in Blut und Darminhalt selektiv Benzpyren und Metabolite zu trennen. Damit konnte folgende Bilanz erstellt werden.

Tabelle 6: Aufnahme und Metabolismus von 3,4-Benzo(a)pyren durch die isolierte Jejunalschlinge

| Fraktion | Bilanz von $^{3}$H-Benzo(a)pyren und seinen Metaboliten 30 Minuten nach Instillation | |
|---|---|---|
| | Darminhalt | Portalblut |
| | (% der Dosis = 100 nMol) | |
| Benzo(a)pyren | 54 ± 22 | 3 ± 2 |
| Metabolite (einschließlich Konjugate) | 6 ± 2 | 37 ± 22 |

Mittelwert und Standardabweichung aus 5 Experimenten.

Bei allen durchgeführten Versuchen erschien nur ein geringer Anteil an freiem Benzpyren im Blut. Der größte Teil wird metabolisiert. Dies steht im Gegensatz zu den Versuchen über den Naphthalinmetabolismus (Tabelle 5) bei denen ein Großteil des Naphthalins die Darmwand unmetabolisiert passiert. In der Mucosa konnten nur etwa 3 bis 5 % der eingegebenen Radioaktivität gefunden werden, ein Hinweis für die geringe Anreicherung bei dieser Versuchsdurchführung. Deshalb wurde der Anteil der Radioaktivität in der Mucosa bei der Aufstellung der Bilanz vernachlässigt.

Diese Experimente wurden mit einer Benzpyrendosis durchgeführt, die bei Nahrungsaufnahme nicht erreicht wird. Es erschien deshalb sinnvoll, den Metabolismus von Spuren von Benzpyren zu untersuchen. Dies war möglich durch Verwendung des $^{3}H$-Benzpyrens mit einer hohen spezifischen Radioaktivität. Trotz der geringen Dosis von 10 pMol konnten etwa 50 bis 80 % der Radioaktivität wiedergefunden werden.

Wie Tabelle 7 zeigt, erscheint auch hier ein geringer Anteil an unmetabolisiertem Benzpyren im Blut.

Tabelle 7: Aufnahme und Metabolismus von Benzo-(a)pyren durch die isolierte Jejunalschlinge

| Fraktion | Bilanz von $^{3}$H-Benzo(a)pyren und seinen Metaboliten 30 Minuten nach Instillation | |
|---|---|---|
| | Darminhalt | Portalblut |
| | (% der Dosis = 10 pMol) | |
| Benzo(a)pyren | 22 ± 12 | 0,7 ± 0,5 |
| Metabolite (einschließlich Konjugate) | 16 ± 5 | 34 ± 21 |

Mittelwert und Standardabweichung aus 10 Experimenten

Um den prozentualen Anteil der Benzpyrenkonjugate im Blut abzuschätzen, wurde Plasma (da wie geschildert bei Extraktion von Blut mit Athylacetat ein Farbstoff mitextrahiert wird) nach 2.13.1.b) extrahiert. Der Rückstand wurde anschließend mit ß-Glucuronidase gespalten und nochmals extrahiert. Durch Auszählen des Rückstandes wurde die Restfraktion ermittelt.

Tabelle 8: Metabolismus von Benzo(a)pyren durch die isolierte Jejunalschlinge

| Fraktion | Anteil an $^{3}$H-Benzo(a)pyren und seinen Metaboliten im Plasma 30 Minuten nach Instillation (Dosis = 10 pMol) |
|---|---|
| | (Gesamtradioaktivität im Plasma = 100 %) |
| Benzo(a)pyren | 4 ± 2 |
| Äthylacetatextrahierbare Metabolite u. Sulfatester | 64 ± 15 |
| Glucuronide | 20 ± 11 |
| Rest | 12 ± 10 |

Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten

Da bei der Extraktion mit Äthylacetat freies Benzpyren mitextrahiert wird, wurde der Anteil des Benzpyrens getrennt durch Hexanextraktion nach 2.13.1.a) bestimmt und von der Fraktion abgezogen, die mit Äthylacetat extrahiert wurde.

Da nach (47) auch Sulfatester durch Äthylacetat extrahiert werden, enthält die als "Äthylacetat-extrahierbare Metabolite" bezeichnete Fraktion Metabolite außer Konjugate und als einzige Konjugate die Sulfatester.

Wie die Tabelle zeigt, liegen etwa 20 % der Radioaktivität des Plasmas in Form von Glucuroniden vor.

# 4. Diskussion

## 4.1. Reinigung der mikrosomalen GT mit 1-Naphthol als Substrat

Die hier beschriebene Reinigungsmethode erlaubt die Isolierung einer GT (1-Naphthol als Substrat) mit hoher spezifischer Aktivität, die, wie die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zeigt, als einheitliches Protein vorliegt. Bei den bislang durchgeführten Methoden zur Reinigung der GT wurde versucht, nach Solubilisierung des Enzyms in Gegenwart von Detergentien wie Brij 58 (22), Emulgen 911 (118) oder Lubrol 12 A 9 (34) eine Abtrennung von Fremdprotein und den Lipiden der Membran vorzunehmen. Die verwendeten Methoden waren Gelfiltration (z.B. Sephadex G-200 oder Bio-Gel A-1,5 m) (84, 80) zur Auftrennung nach Molekülgröße und Ionenaustauschchromatographie an Kationen- und Anionenaustauschern. Dadurch konnten Präparationen erhalten werden, die nach Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese noch zwei bis drei unterscheidbare Banden zeigten (22, 34).

Ohne Affinitätschromatographie war jedoch eine Reinigung bis zur Homogenität nicht möglich. Viele Proteine der mikrosomalen Membran besitzen ein Molekulargewicht im Bereich zwischen 50 000 und 60 000 Dalton, z.B. Cytochrom P 450, Cytochrom P 448 (101), die Epoxidhydratase (16, 69, 78) oder die Gulonolacton-Oxidase (86, 88). Eine Auftrennung durch Gelfiltration ist deshalb recht schwierig. Außerdem bilden die hydrophoben Pro-

teine nach Herauslösen aus der Membran hochmolekulare Aggregate, die durch Gelfiltration schlecht trennbar sind (84, 79, 78). Auch eine Chromatographie an Ionenaustauschern scheint keine völlige Abtrennung von Fremdprotein zu bewirken. Burchell erhält nach Chromatographie an Ionenaustauschern eine starke Anreicherung der GT, jedoch eine ebenfalls starke Zunahme der Aktivität der Epoxidhydratase (34). Danach scheint die Epoxidhydratase in engem Kontakt mit der GT vorzuliegen. Auch Gorski und Kasper (46) berichten, daß die Entfernung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 53 000 Dalton sich als sehr schwierig erwies. Versuche in unserer Arbeitsgruppe, eine Reinigung der GT durch Adsorption an Hydroxylapatit und hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose$^{R}$ zu erreichen, führten ebenfalls nicht zu einem homogenen Präparat. Erst durch die Chromatographie an UDP-Hexanolamin-Sepharose 4B war es möglich, die GT bis zur Homogenität zu reinigen.

Die gereinigte Präparation zeigt nach Analyse durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 54 000 Dalton. Wie Abbildung 6 zeigt, liegt das Molekulargewicht der in der vorliegenden Dissertation beschriebenen GT deutlich unter dem der Katalase (Molekulargewicht 58 000 Dalton). Von Burchell (33) wird ein Molekulargewicht von 57 000 Dalton angegeben, während Gorski und Kasper ein Molekulargewicht von 59 000 Dalton für die Hauptbande angeben (46).

Die spezifische Aktivität der gereinigten GT lag etwa 190-fach über der des Leberhomogenats bei mit Methylcholanthren vorbehandelten Ratten. Von Gorski und Kasper wird eine 150-200-fache Zunahme der spezifischen Aktivität des Homogenats nach Vorbehandlung mit Phenobarbital erzielt (46). Die in der Arbeit erreichten spezifischen Aktivitäten von 4200 bis 8100 nMol/Min. mg Prot. sind den von Burchell erzielten vergleichbar (33). Die erreichte spezifische Aktivität ist jedoch nur bedingt ein Maß für den Reinheitsgrad, da das lipidabhängige Enzym bei Verlust der natürlichen Membranumgebung instabil wird.

Die hier durchgeführte Reinigung ermöglicht schon bis zur Stufe der DEAE-Cellulose-Säule eine starke Abtrennung des Phospholipids von 0,34 mg Phospholipid/mg Protein in den Ausgangsmikrosomen bis 0,01 mg/mg Protein bei der DEAE-Cellulose-Säule (22, 24). Bei einem mittleren Molekulargewicht von 800 Dalton für die Phospholipide und etwa 50 000 für die mikrosomalen Proteine entspricht der Phospholipidgehalt in der DEAE-Cellulose-Fraktion etwa 0,6 Mol Phospholipid/Mol Protein. Auch Burchell kann eine etwa 35-fache Abtrennung von Phospholipid auf 0,7 Mol/Mol Protein erreichen, während Gorski und Kasper ein stark phospholipidhaltiges Präparat erhalten. Durch Behandlung des teilgereinigten Enzyms mit Protease-freier Phospholipase $A_2$ und Phospholipase C konnte das Enzym nicht inaktiviert werden (68). Die Zugabe von Lysolecithin

zum gereinigten Enzym ergibt nur eine geringe Zunahme der spezifischen Aktivität um etwa 20 % (73 ). Jedoch kann bei einem partiell denaturierten Enzym eine starke Aktivitätszunahme erzielt werden. Brij 58 scheint nur teilweise die Rolle der Phospholipide zu übernehmen und das Enzym stabilisieren zu können.

Die beschriebene Reinigung wird derzeit bezüglich der Ausbeute optimiert. Auch beim Auftragen hoher Enzymmengen konnte bei der SDS-Polyacylamidgelelektrophorese eine Bande wie in Abbildung 6 erhalten werden. Es zeigten sich keine Nebenbanden.

Von Del Villar et al (118) wurde nach Solubilisierung eine Auftrennung in eine p-Nitrophenol- und Morphin-GT an DEAE-Cellulose beschrieben. Mit der hier geschilderten Reinigungsmethode gelang es Dr. D. Josting ausgehend von Lebern von phenobarbitalbehandelten Ratten die Naphthol-GT und die Morphin-GT zu trennen und bis zur apparenten Homogenität zu reinigen (24). Neuerdings gelang es Tukey et al. (108), auf ähnliche Weise eine Oestron- und p-Nitrophenol-Form der GT zu trennen. Die molekulare Basis für das Auftreten verschiedener Enzymformen ist noch nicht geklärt. Von Weatherill und Burchell (122) wird die Reinigung der Naphthol-GT von homozygoten Gunn-Ratten berichtet, die durch erblichen Mangel an GT-Aktivität für Bilirubin gekennzeichnet sind (49). Das Enzym soll ein ähnliches Molekulargewicht und ähnliche immunologische Eigenschaften haben wie ein aus Wistarratten gereinigtes Enzym.

Die Isolierung des reinen Enzyms erlaubt das Studium vieler offener Fragen. Es könnte die Substratspezifität der verschiedenen Formen der GT abgeklärt werden. Mit Hilfe von Antikörpern gegen das gereinigte Enzym könnte die Enzymmenge besser bestimmt werden. Es wird damit möglich, die molekulare Basis für die Phänomene Induktion, Aktivierung, Heterogenität, Phospholipidabhängigkeit usw. zu erhellen. Durch vergleichende Studien am gereinigten und mikrosomalen Enzym könnten die verschiedenen Faktoren erkannt werden, die die Enzymaktivität in der Membran bestimmen.

In diesem Zusammenhang sind die Studien über die Hin- und Rückreaktion der Naphtholglucuronidierung zu sehen. Das Substrat der Hinreaktion, 1-Naphthol, ist stark lipidlöslich. Unter den durchgeführten Testbedingungen befinden sich in einem Inkubationsvolumen von 1 ml 0,5 µMol 1-Naphthol und 1 mg mikrosomales Protein. Bei der Verteilung von $^{14}$C-Naphthol zwischen Mikrosomensuspension und Puffer sind unter den Bedingungen des Enzymtests etwa 50 % des Naphthols also 0,25 µMol an die Mikrosomen gebunden (68 ). Das Phospholipid/Proteinverhältnis der Mikrosomen beträgt 0,34 mg Phospholipid/mg Protein (22). 1/0,34 mg Phospholipid enthalten dann 0,25 µMol Naphthol. Nimmt man eine Dichte von 1 g/ml für die Phospholipiddoppelschicht an (59), so ergibt sich dort eine Konzentration von 0,7 Mol/l (93). Wenn das aktive Zentrum direkten Zugang zur Phospholipiddoppelschicht hat (18, 51, 52, 131),

steht für das Enzym demnach eine ganz andere Substratkonzentration (0,7 Mol/l) zur Verfügung als die, die man bei Gleichverteilung des Substrats im Testvolumen berechnet (0,5 mM/l). Das bedeutet, daß in den bestimmten $K_M$-Wert die Verteilung der Substrate zwischen Mikrosomen und wässriger Phase mit eingeht.

Für die Rückreaktion der Naphtholglucuronidierung bestehen insofern ganz andere Verhältnisse, als hier nur wasserlösliche Substrate 1-Naphtholglucuronid und UDP zur Reaktion gelangen.

Die Abnahme des Verhältnisses Hin- zu Rückreaktion ist möglicherweise so zu verstehen, daß in der Membran Faktoren vorliegen, die die Hinreaktion begünstigen, die aber bei der Reinigung abgetrennt werden. Auch eine Konformationsänderung des Enzyms ist denkbar, so daß die Substrate der Rückreaktion im teilweise gereinigten Präparat besser umgesetzt werden.

## 4.2. Bestimmung der Glucuronidierung in verschiedenen Geweben

Als Beitrag zur Fragestellung der funktionellen Heterogenität der GT wurde die Glucuronidierung in extrahepatischen Geweben für verschiedene Substrate untersucht. Um möglichst sicher die Existenz einer GT-Aktivität für die untersuchten Substrate feststellen zu können, wurde die Bestimmung auch nach Induktion durchgeführt. Der Induktorstoff Aroclor 1254 stellt ein Gemisch polychlorierter Biphenyle dar mit einem mittleren Anteil von 54 % Chlor (8). Das Sub-

stanzgemisch besitzt Induktionswirkung sowohl für die Naphthol-GT als auch für die Morphin-GT (21, 7). Es vereinigt also die Induktionswirkung von Phenobarbital und Methylcholanthren in der Leber. Polychlorierte Biphenyle sind vielfach verwendete Industriechemikalien. Durch Umweltverschmutzung konnte eine starke Anreicherung dieser lipidlöslichen Stoffe in tierischen Geweben, in Milch und sogar im menschlichen Fettgewebe festgestellt werden (61, 94). Wie verschiedene Untersuchungen zeigen, wirken diese Stoffe als starke Induktoren der fremdstoffabbauenden Enzyme (7, 8). Aroclor 1254 zeigt eine Zusammensetzung, die stark derjenigen ähnelt, die in Extrakten des menschlichen Fettgewebes gefunden wurde (94). Als stark lipidlöslicher Stoff wird Aroclor 1254 nur langsam eliminiert und wirkt deshalb längere Zeit induzierend. Wie Tabelle 4 zeigt, ist eine GT-Aktivität für 1-Naphthol als empfindlichster Meßmethode in allen fünf untersuchten Geweben meßbar. Für die Substrate Morphin und Bilirubin ist eine GT-Aktivität in den Organen Leber, Niere und Darm, nicht jedoch in Milz und Lunge nachweisbar. Auch nach Induktion kann in Lunge und Milz keine GT-Aktivität mit Sicherheit angegeben werden. Es erhebt sich nun die Frage, ob unter der Annahme, das Verhältnis Naphthol-GT zu Morphin-GT zu Bilirubin-GT in verschiedenen Geweben sei gleich wie das in der Leber, die GT-Aktivität auch für Morphin und Bilirubin in Milz und Lunge hätte nachweisbar sein müssen.

Auch unter den relativ unempfindlichen Testbedingungen hätte eine Aktivität eindeutig für Morphin, sogar auch für Bilirubin schon im Homogenat meßbar sein müssen. Da nicht einmal nach Induktion die Meßwerte eindeutig über dem Nullwert lagen, scheint die GT in Milz und Lunge, verglichen mit der Leber, verändert zu sein. Auch in der Niere sind Unterschiede feststellbar. Wie Abbildung 10 zeigt, ist die prozentuale GT-Aktivität für Morphin in der Niere deutlich niedriger als die der Naphthol-GT. Die prozentuale GT-Aktivität für Bilirubin der Niere ist jedoch mit der Aktivität der Naphthol-GT vergleichbar. Wie Abbildung 11 zeigt, erweist sich die Naphthol-GT als induzierbar, ebenso die Morphin-GT der Leber. Nicht induzierbar scheint jedoch die Bilirubin-GT der Leber und Niere zu sein.

Interessant ist ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Naphthol-GT im nativen Zustand und unter Aktivierung. Im nicht aktivierten Zustand besitzt die extrahepatische GT-Aktivität gegenüber der Leber eine größere Bedeutung als im aktivierten Zustand. Die Aktivität der Darm-GT übersteigt im nativen Zustand sogar die der Leber-GT. Die hohe spezifische Aktivität im Darm ohne Zugabe von Detergens könnte durch Spontanaktivierung durch im Darm vorhandene Lipasen bzw. Proteasen erklärt werden (67). Zugabe von Detergens wirkt dann eher hemmend. Eine unterschiedliche Aktivierbarkeit der GT in verschiedenen Geweben nach Zugabe von Aktivatorstoffen

wurde auch von Aitio beobachtet (4). Zum Teil können die Unterschiede durch Aktivierung bzw. Hemmung durch Gewebskomponenten während der Präparation erklärt werden. Es existieren jedoch ebenso Unterschiede in der Mikroumgebung des Enzyms in der mikrosomalen Membran (4). Das Induktionsverhalten der GT ähnelt demjenigen, das Grote et al. (48) für die Substrate 4-Nitrophenol und 4-Methylumbelliferon an der Leber untersucht haben.

Da Xenobiotica neben Aufnahme durch Lunge oder Haut durch den Magen-Darm-Trakt in den Organismus gelangen, ist die Induktion nach oraler Gabe interessant. Durch die Nahrung aufgenommene Stoffe werden oftmals durch eine Folge von Phase-I- und Phase-II-Reaktion metabolisiert. Deshalb wurde hier das Induktionsverhalten der GT mit dem der Monooxygenase verglichen. Wie Studien von Ullrich und Weber (109) ergaben, sind an der O-Dealkylierung von 7-Ethoxycumarin mindestens zwei Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasen beteiligt. Um eine generelle Monooxygenase-Aktivität des Darmes zu untersuchen, bot sich deshalb dieses Substrat mit überlappender Spezifität an.

Die GT-Aktivität zeigt ein Maximum nach 24 Stunden, während die maximale Monooxygenase-Aktivität früher meßbar ist. Auch Grote et al (48) und Aitio et al (6) konnten nach Induktion die maximale GT-Aktivität nach der der Monooxygenase erhalten. Die rasche Zunahme der Monooxygenase-Aktivität ähnelt Untersuchungen, die von Scharf

und Ullrich (103) am Mäusedünndarm durchgeführt wurden. Sie beobachteten eine maximale O-Desalkylierungsaktivität schon nach 120 Minuten.

Nach Berlin und Schimke (17) erreichen Enzyme mit kurzer Halbwertszeit schneller ihren neuen Steady-State-Zustand als Enzyme mit langsamem Turnover. Der Befund, daß die maximale GT-Aktivität später als die der Monooxygenase erreicht wird, könnte folglich durch eine längere Halbwertszeit der GT erklärt werden. Die hohe Regenerationsleistung der Darmmucosa (32 bis 38 Stunden bei der Ratte) (91, 71), bei der stets neue Zellen in den Krypten gebildet werden und nach oben wandern, bewirkt außerdem einen raschen Turnover der Enzyme.

## 4.3. Metabolismus von Naphthalin und Benzpyren im perfundierten Darm

Um die Relevanz von Studien an isolierten Enzymen für pharmakologische und toxikologische Fragen abschätzen zu können, sind vergleichende Studien an subzellulären und zellulären Systemen nötig. Als Beispiel für den Metabolismus im intakten Organ wurde in der vorliegenden Arbeit der Metabolismus von Naphthalin und Benzpyren in der isoliert perfundierten Dünndarmschlinge untersucht. Bei den hier untersuchten Fremdstoffen spielt das Verhältnis von oxidierenden und konjugierenden Enzymen für die Entgiftung und Elimination eine große Rolle. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sind häufig vorkom-

mende Umweltstoffe, deren kanzerogene, mutagene und cytotoxische Wirkung bekannt ist (54). Bei Naphthalin sind noch keine primär kanzerogene Wirkungen nachgewiesen worden. Es erzeugt jedoch Linsentrübung des Auges und Methämoglobinämien (113, 95). Es wird ähnlich wie seine höheren Homologen metabolisiert, besitzt jedoch eine überschaubare Anzahl an Metaboliten und eignet sich deshalb besonders als Vergleichssubstanz zu komplizierteren aromatischen Systemen wie Benzpyren. Eine Untersuchung an isoliert perfundierten Organen ermöglicht Studien, die den In-vivo-Bedingungen recht nahe kommen, jedoch nur den Metabolismus des untersuchten Organs erfassen. Außerdem ist eine Bilanzierung der Metabolite leicht möglich.

Das System der isoliert perfundierten Darmschlinge weist einen wesentlichen Unterschied gegenüber Studien an Zellen oder Zellfraktionen auf. Das in den Darminhalt applizierte Substrat tritt unter Metabolisierung durch die Darmwand und wird anschließend im Blut abtransportiert. Das bedeutet, daß die Summe aus Substrat und Metaboliten während des Versuchs durch Abtransport durch das Blut laufend abnimmt (Abbildung 19). Bei Versuchen an Zellen, Homogenaten oder Zellfraktionen ist jedoch ein geschlossenes System vorhanden, d.h. weder die Substrate noch die Metabolite werden aus dem Reaktionsansatz entfernt.

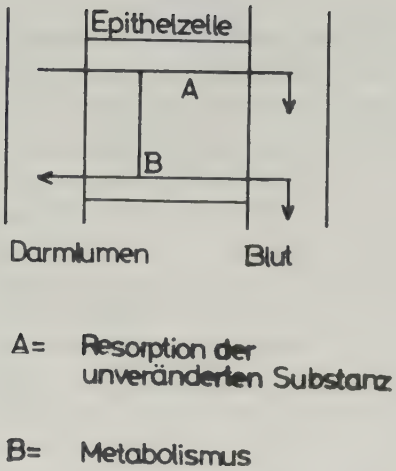



Abbildung 19: Metabolismus in der Darmmucosa

Bei den Versuchen zur Naphthalinmetabolisierung im Dünndarm (Tabelle 5) fällt auf, daß ein Großteil des Naphthalins die Darmwand unmetabolisiert passiert. Wahrscheinlich ist die Metabolisierung von Naphthalin recht langsam, der Durchtritt durch die Darmwand jedoch so schnell, daß nur ein geringer Umsatz erfolgt. Als Metabolite wurden dabei hauptsächlich 1-Naphthol und Naphthalindihydrodiol gefunden (Abbildung 16), die zu einem beträchtlichem Teil (ca. 40 %) glucuronidiert waren.

Der Metabolismus von Benzpyren im Dünndarm der Ratte wurde bereits an isolierten Darmzellen und Zellfraktionen untersucht (110, 3, 106, 107, 92, 120, 121, 132, 56). Dabei kann eine große Anzahl von Primärmetaboliten gefunden werden. Von Stohs et al (107) wurden zunächst hauptsächlich 3-Hydroxybenzpyren und Benzpyren-4,5-epoxid neben geringen Anteilen an 9-Hydroxybenzpyren, 3,6-Chinon und 1,6 Chinon gefunden. Dihydrodiole wurden anfangs kaum gebildet. Nach 30-minütiger Inkubation nimmt der Anteil der Dihydrodiole jedoch stark zu, der Anteil des Benzpyren-4,5-epoxids stark ab. Bei Spaltung mit ß-Glucuronidase nimmt der Anteil an 3-Hydroxybenzpyren zu, ein Hinweis, daß Phenole stark glucuronidiert werden. Als stärkstes ultimales Karzinogen ist bisher das Benzpyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid bekannt (60). Die Konjugatbildung könnte möglicherweise eine Schlüsselposition bilden, indem sie die Bildung dieses Metaboliten durch Konjugation des Benzpyren-7,8-dihydrodiols reduziert. Wie Grafström et al (47) zeigten, ähnelt das Muster der Metabolite im Darm demjenigen der Leber in Gegenwart eines Inhibitors der Epoxidhydratase. Offensichtlich besitzt der Darm eine relativ geringe Epoxidhydratase-Aktivität.

Bei den in Abbildung 18 gezeigten Chromatogrammen wandert bei dem verwendeten Fließmittel unmetabolisiertes Benzpyren am weitesten. Stark polare Verbindungen wie Tetrahydrotetrole, polyhydroxylierte Phenole oder Sulfatkonjugate verbleiben an der Startstelle (66), während

Dihydrodiole, Phenole und Chinone im mittleren Bereich des Chromatogramms erscheinen.

Das von Lebermikrosomen erhaltene Chromatogramm der Benzpyrenmetabolite, das als Vergleich mitchromatographiert und analog aufgearbeitet wurde, ähnelt demjenigen, das Jones et al (66) an Hepatozyten fanden. Wie das Chromatogramm des Extraks von Portalplasma zeigt, kann neben geringen Mengen an freiem Benzpyren Radioaktivität im Bereich der Phenole und Chinone nachgewiesen werden. Auffallend ist der hohe Anteil an Radioaktivität, der an der Startstelle verbleibt. Auch Benzpyren, das durch Extraktion nach de Pierre et al (39) gereinigt wurde, zeigt Radioaktivität an der Startstelle, die jedoch wesentlich geringer ist. Da das Chromatogramm keine klaren Maxima zeigt, war es nicht möglich, einzelne Metabolite zu identifizieren. Trotz Arbeiten unter Lichtabschluß und Stickstoffatmosphäre kann eine Weitermetabolisierung während der Aufarbeitung nicht ausgeschlossen werden.

Wie Tabelle 6 zeigt, verbleibt im Gegensatz zu Naphthalin ein beträchtlicher Anteil des Benzyrens noch im Darminhalt. Das Benzpyrenmolekül wird also langsamer aufgenommen, wird aber stärker metabolisiert.

Benzpyren ist ein Stoff, der praktisch ubiquitär vorkommt und deshalb auch durch die Nahrung aufgenommen wird. Interessant ist, daß es in Pflanzen das Wachstum fördert, wobei es umstritten ist, ob es von ihnen selbst als Wuchsstoff

synthetisiert wird ( 43 ). Nach Schätzungen nimmt der Mensch durch Nahrung und Atmung täglich etwa 7 µg Benzpyren auf ( 82 ). Es erschien deshalb wichtig zu erfahren, ob unmetabolisiertes Benzpyren bei Aufnahme von Spuren, wie sie in der Nahrung erscheinen, im Blut nachweisbar ist, oder ob die Darmmucosa in der Lage ist, es völlig zu metabolisieren. Von besonderem Interesse war der Anteil der Glucuronidbildung, da durch Konjugation die Ausbildung karzinogener Metabolite möglicherweise vermindert wird (21). Aus den durchgeführten Experimenten läßt sich schließen, daß der Anteil des freien Benzpyrens, der im Blut erscheint, gering ist. Bei Extraktion mit Hexan, wie sie zur Bestimmung von Benzpyren angewandt wurde, ließ sich jedoch in der Hexanphase Radioaktivität eindeutig nachweisen, die den Tritiumaustausch und unselektive Extraktion von Metaboliten übersteigt. Daraus kann geschlossen werden, daß geringe Mengen an unmetabolisiertem Benzpyren im Blut erscheinen, die jedoch dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar waren. Wie Tabelle 8 zeigt, erscheint im Plasma des Portalbluts ein beträchtlicher Anteil an Glucuroniden.

Ein erheblicher First-Pass-Effekt durch die Darmmucosa wird auch bei Pharmaka (z.B. Morphin) und bei Fremdstoffen wie 1-Naphthol beobachtet (67).

Literaturverzeichnis


1 Affinity Chromatography, Principles and Methods, Pharmacia Fine Chemicals, 8-15

2 Aitio, A., Academic Dissertation, Turku (1973)

3 Aitio, A. (1974) Res. Comm. in Chem. Path. Pharm. 9, 701-710

4 Aitio, A. (1974) Int. J. Biochem. 5, 617-621

5 Aitio, A. (1974) Int. J. Biochem. 5, 325-330

6 Aitio, A., Vainio, H., Hanninen, O. (1972) FEBS Letters 24, 237-240

7 Alvares, A.P. (1977) 3 rd Symp on Microsomes and Drug Oxidations, Pergamon Press, Oxford 476-483

8 Alvares, A.P., Bickers, D.R., Kappas, A. (1973) Proc. Natl. Acad Sci. USA 70, 1321-1325

9 Alvares, A.P., Schilling, G., Lewin, W., Kuntzman, R., (1967) Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 521-526

10 Arion, W.J., Wallin, B.K. (1972) J. Biol. Chem. 247, 2558-2565

11 Axelrod, J. (1955) J. Biol. Chem. 214, 753-763

12 Axelrod, J., Inscoe,J.K. Tomkins, G.M. (1958) J. Biol. Chem. 232, 835-841

13 Axelrod, J., Schmid, R., Hammaker, L. (1957) Nature 180, 1426-1427

14 Barker, R., Olsen, K.W., Shaper, J.H., Hill, R.L. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7135-7147

15 Beaufay,H., de Duve,C. (1954) Bull.Soc.Chim. Biol. 36, 1551-1557

16 Bentley,P., Oesch,F., (1975), FEBS Letters 59, 291-299

17 Berlin,C.M., Schimke,R.T. (1965) Mol.Pharm. 1, 149-156

18 Berry,C., Hallinan,T. (1974) FEBS Letters 42, 73-76

19 Berry,C., Hallinan,T. (1976) Biochem.Soc. Trans. 4, 650-652

20 Birke,F.W. (1976) Diplomarbeit Fachbereich Chemie/Biochemie, Universität Tübingen

21 Bock,K.W. (1977) Arch.Toxicol. 39, 77-85

22 Bock,K.W. Clausbruch v.,U.C., Josting,D., Ottenwälder,H., (1977) Biochem.Pharm. 26, 1097-1100

23 Bock, K.W., Clausbruch v.,U.C., Ottenwälder, H. (1978) Biochem.Pharm. 27, 369-371

24 Bock,K.W., Kittel,J., Josting,D. (1978) Conjugation Reactions in Drug Biotransformation (Aitio,A., E.) Elsevier/North-Holland, in Druck, Proc.Symp. Turku, Finnland

25 Bock,K.W., Fröhling,W., Remmer,H., Rexer,B. (1973) Biochim.Biophys.Acta 327, 46-56

26 Bock,K.W., Van Ackeren,G., Lorch,F., Birke, F.W. (1976) Biochem.Pharm. 25, 2351-2356

27 Bock,K.W., White,I.N.H. (1974) Europ.J.Biochem. 46, 451-459

28 Bock,K.W., Winne,D. (1975) Biochem.Pharm. 24, 859-862

29 Booth,J., Boyland,E., Turner,E.E. (1950) J.chem.Soc.(Lond.)1188-1190

30 Boyland,E. (1963) Biochemistry of Bladder Cancer, S.35, Springfield III, C.T.Thomas

31 Brodie,B.B., Gilette,J.R., La Du,B.N. (1958) Ann. Rev.Biochem. 27, 427-454

32 Bruckner,J.V., Khanna,K.L., Cornish,H.H. (1973 Toxicol.appl.Pharmacol. 24,434-448

33 Burchell,B. (1977) FEBS Letters 78, 101-104

34 Burchell,B. (1977) Biochem.J. 161, 543-549

35 Carraway,K.L., Shin,B.C. (1972) J.Biol.Chem. 247, 2102-2108

36 Clapp,J.W. (1956) J.Biol.Chem. 223, 207-214

37 Conney,A.H., Miller,E.C., Miller,J.A. (1956) Cancer Res. 16, 450-459

38 Conney,A.H., Miller,E.C., Miller,J.A. (1957) J.Biol.Chem. 228, 753-766

39 De Pierre,J.W., Moron,M.S., Johannesen,K.A.M., Ernster,L. (1975) Anal.Biochem. 63, 470-484

40 Dutton,G.J. (1956) Biochem.J. 64, 693-701

41 Dutton,G.J., Illing,H.P.A. (1972) Biochem.J. 129, 539-550

42 Dutton,G.J., Storey,I.D.E. (1955) Biochem.J. 59, 279-288

43 Forth,W., Henschler,D., Rummel,W. (1975) Allg.u.spez.Pharm.u.Tox. 511

44 Gelboin,H.V., Okuda,T., Selkirk,J., Nemoto,N., Yang,S.K., Wiebel,F.J., Whitlock,J.P., Rapp,H.J., Bast,R.C. (1976) Screening Tests in Chemical Carcinogenesis (Int.Ag. f.Res.on Cancer), 225-247

45 Gielen,J.E., Universität Lüttich, persönliche Mitteilung

46 Gorski,J.P., Kasper,C.B. (1977) J.Biol.Chem. 252, 1336-1343

47 Grafström,R., Stohs,S.J., Burke,M.D., Moldeus,P., Orrenius,S. (1977) 3 rd Symp. on Microsomes and Drug Oxidations, Pergamon Press, Oxford, 667-674

48 Grote,W., Schmoldt,A., Dammann,H.G. (1975) Biochem.Pharm. 24, 1121-1125

49 Gunn,C.H. (1938) J.Hered. 29, 137-139

50 Halac,E., Reff,A. (1967) Biochim.Biophys. Acta 139, 328-343

51 Hänninen,O., Alanen,K. (1966) Biochem.Pharm. 15, 1465-1467

52 Hänninen,O., Puuka,R. (1970) Suomen Kemistibehti 43, 451-456

53 Hartiala,K., (1973) Physiol.Rev. 53 (2) 496-534

54 Heidelberger,C. (1975) Ann.Rev.Biochem. 44, 79-121

55 Henderson,P.Th., Dewaide,J.H. (1969) Biochem. Pharm. 18, 2087-2094

56 Hoensch,H., Woo,C.H., Schmid,R. (1975) Biochem.Biophys.Res.Comm. 65, 399-406

57 Holloway,P.W., Anal.Biochem (1973) 53, 304-307

58 Howland,R.D., Burkhalter,A., Trevor,A.L., Hegeman,S., Shirachi,D.Y. (1971) Biochem. J. 125, 991-997

59 Huang,C. (1969) Biochemistry 8, 344-352

60 Huberman,E., Sachs,L., Yang,S., Gelboin,H.V. (1976) Proc.nat.Acad.Sci 73, 607-611

61 Ikkala,J., Määttä,K., Isomäki,M., Arstila,A.U. (1976) Acta pharm.et toxicol. 39, 545-554

62 Isselbacher,K.J., Axelrod,J. (1955) J.Am. Chem.Soc. 77, 1070-1071

63 Isselbacher,K.J., Chabras,M.F., Quinn,R.C. (1962) J.Biol.Chem. 237, 3033-3036

64 Jacobson,M., Levin,W., Poppers,P.J., Wood, A.W., Conney,A.H. (1974) Clin.Pharm.Ther. 16, 701-710

65 Jerina,D.M., Daly, J.W., Witkop,B., Zaltzman-Nirenberg,P., Udenfriend,S. (1970 Biochemistry 9, 147-155

66 Jones,C.A., Moore,B.P., Cohen,G.M., Fry,J.R., Bridges,J.W. (1978) Biochem. Pharm. 27, 693-702

67 Josting,D., Bock,K.W., Winne,D. (1976) Biochem.Pharm. 25, 613-616

68 Josting,D. (1977) Doktorarbeit Fachbereich Pharmazie d. Universität Tübingen

69 Knowles,R.G., Burchell,B. (1977)Biochem.J. 163, 381-383

70 La Du,B.N., Gaudette,L., Trousof,N., Brodie, B.B. (1955) J.Biol.Chem. 214, 741-752

71 Leblond,C.P., Stevens,C.E., 1948, Anat.Rec. 1oo, 357-360

72 Levy,G.A. (1952) Biochem.J. 52, 464-472

73 Lilienblum,W., Bock,K.W., unveröffentlichte Versuche

74 Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275

75 Lu,A.Y.H., Kuntzman,R., West,S., Conney,A.H. (1971) Biochem.Biophys.Res.Comm. 42, 12oo-1206

76 Lu,A.Y.H., Levin,W. (1972) Biochem.Biophys. Res.Comm. 46, 1334-1339

77 Lu,A.Y.H., Ryan,D., Kawalek,J., Thomas,P., West,S.B., Huang,M.T., Levin,W. (1976) Biochem.Soc.Trans. 4, 169-172

78 Lu,A.Y.H., Ryan,D., Jerina,D.M., Daly,J.W., Levin,W. (1975) J.Biol.Chem. 250, 8283-8288

79 Lucier,G.W., Mc Daniel,O.S., Hook,G.E.R. (1975) Biochem.Pharm. 24, 325-334

80 Lucier,G.W., Mc Daniel,O.S., Matthews,H.B. (1971) Arch.Biochem.Biophys. 145, 520-530

81 Lueders,K.K., Kuff,E.L. (1967) Arch.Biochem. Biophys. 120, 198-203

82 Lutz,W.K., Schlatter,Ch. (1978) Arch.Toxicol. Suppl. 1, 369,371

83 Miettinen,T.A., Leskinen,E. (1963) Biochem. Pharm. 12, 565-575

84 Mowat,A.P., Arias,I.M. (1970) Biochim.Biophys. Acta 212, 65-78

85 Mulder,G.J. (1970) Biochem.J. 117, 319-324

86 Nakagawa,H., Asano,A., Sato,R. (1975) J.Biochem. 77, 221-232

87 Neville,D.M. (1971) J.Biol.Chem. 246, 6328-6334

88 Nishikimi,M., Tolbert,B.M., Udenfriend,S. (1976) Arch. Biochem.Biophys. 175, 425-435

89 Oesch,F. (1973) Xenobiotica 3, 305-340

90 Otani,G., Makarem, Abou el, M.M., Bock,K.W. (1976) Biochem.Pharm. 25, 1293-1297

91 Padykula,H.A. (1962) Fed.Proc. 21, 873-879

92 Pantuck,E.J., Hsiao,K.-C., Loub,W.D., Wattenberg,L.W., Kuntzman,R., Conney,A.H. (1976) J.Pharm.Exp.Ther. 278-283

93 Parry,G., Palmer,D.N., Williams,D.J. (1976) FEBS Letters 67, 123-129

94 Price,H.A., Welch,R.L. (1972) Environ.Health Persp. 1,73

95 Rees,J.R., Pirie,A., (1967) Biochem.J. 102, 853-863

96 Remmer,H. (1959) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm. 235, 279-290

97 Remmer,H. (1959) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm. 237, 296-307

98 Remmer,H. (1964) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm. 247, 461-468

99 Remmer,H. (1972) Rev.Can.Biol. 31, 193-222

100 Remmer,H., Schoene,B., Fleischmann,R.A. (1973) Drug Met.Disp. 1, 224-230

101 Ryan,D., Lu,A.Y.H., Kawalek,J., West,S.B., Levin,W. (1975) Biochem. Biophys.Res.Comm. 64, 1134-1141

102 Sanchez,E., Tephly,T.R. (1974) Drug Met.Disp. 2 (3), 247-253

103 Scharf,R., Ullrich,V., (1974) Biochem.Pharm. 23, 2127-2137

104 Sims,P. (1967) Biochem.Pharm. 16, 613-618

105 Smith,H.G., Smith,W.R.D., Jepson,J.B., Sorensen,K. (1970) Biochem.Pharm. 19, 1689-1693

106 Stohs,S.F., Grafström,R.C., Burke,M.D., Moldeus,P.W., Orrenius,S.G. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 177, 105-116

107 Stohs,S.J., Grafström,R.C., Burke,M.D., Orrenius,S. (1977)Arch.Biochem.Biophys. 179, 71-80

108 Tukey,R.H., Billings,R.E., Tephly,T.R. (1978) Biochem.J. 171, 659-663

109 Ullrich,V., Weber,P. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 353, 1171-1177

110 Vadi,H., Moldeus,P., Capdevila,J., Orrenius,S. (1975) Cancer Research 35, 2083-2091

111 Van Ackeren,G. (1976) Diplomarbeit Fachbereich Chemie/Biochemie, Universität Tübingen

112 Van Cantfort, J., De Graeve,J., Gielen,J.E. (1977) Biochem.Biophys.Res.Comm. 79, 505-512

113 Van Heyningen,R., Pirie,A. (1967) Biochem.J. 102, 842-852

114 Van Roy,F.P., Heirwegh,K.P.M. (1968) Biochem.J. 107, 507-518

115 Vessey,D.A., Goldenberg,J., Zakim,D. (1973) Biochim.Biophys.Acta, 309, 58-63

116 Vessey,D.A., Goldenberg,J., Zakim,D (1973) Biochim.Biophys.Acta 309, 75-82

117 Vessey,D.A. Zakim, D. (1974) Biochem.J. 139, 243-249

118 Villar,del E., Sanchez,E., Autor,A.P., Tephly,T.R. (1975) Mol.Pharm. 11, 236-240

119 Villar,del E., Sanchez,E., Tephly,T.R. (1977) Drug Metab.Disp. 5, 273-278

120 Wattenberg,L.W. (1971) Cancer 28, 99-102

121 Wattenberg,L.W., Leong,J.L., Strand,P.J. (1962) Cancer Research 22, 1120-1125

122 Weatherill,P.J., Burchell,B. (1978) FEBS Letters 87, 207-211

123 Williams,R.T. (1959) Detox.Mech.2nd Edition p. 492

124 Winne,D. (1966) Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm.Exp.Path. 254, 199-224

125 Wishart,G.J., Mossman,S., Donald,A., Dutton, G.J. (1977) Biochem.Soc.Trans. 5, 751-723

126 Yeh,S.Y. (1974) J.Pharm.Exp.Ther.192, 201-21o

127 Yeh,S.Y., Woods,L.A. (1970) J.Pharmaceut. Scien. 59 (3), 380-383

128 Zakim,D., Vessey,D.A. (1972) Arch.Biochem. Biophys. 148, 97-100

129 Zakim,D., Vessey,D.A. (1974) Biochem.Soc. Trans. 2, 1165-1167

130 Zakim,D., Vessey,D.A. (1975) Membrane bound enzymes (Ed.A.Martonosi) Plenum Press, New York

131 Zakim,D., Vessey,D.A. (1977) J.Biol.Chem. 252, 7534-7537

132 Zampaglione,N.G., Mannering,G.J. (1973) J.Pharm.Exp.Ther. 185, 676-684

Zusammenfassung

Die mikrosomale UDP-Glucuronyltransferase (GT) gehört zu den fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, die lipidlösliche Verbindungen in polare, eliminierbare Produkte überführen. Viele Hinweise sprechen für das Vorliegen mehrerer substratspezifischer Formen der GT, z.B. für die Substrate 1-Naphthol, Morphin und Bilirubin. Die Naphthol-GT der Rattenleber wurde bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Reinigungsverfahren umfaßte: Solubilisieren des Enzyms mit Natriumcholat, Ammoniumsulfatfällung, Gelausschuß, DEAE-Cellulose- und Affinitätschromatographie an UDP-Hexanolamin-Sepharose 4B. Die Analyse durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zeigte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 54 000. Bedingungen zur Bestimmung der Hin- und Rückreaktion der Naphthol-GT werden angegeben.

Die Naphthol-GT ließ sich in vielen extrahepatischen Geweben der Ratte nachweisen, z.B. in Darm, Niere, Lunge und Milz. Die Glucuronidierung von Morphin und Bilirubin ließ sich außer in der Leber auch in Darm und Niere, nicht jedoch in Lunge und Milz nachweisen. Nach Behandlung von Ratten mit einem Gemisch polychlorierter Biphenyle (Aroclor 1254; 500 mg/kg, intraperitoneal) ließ sich die Naphthol-GT in allen untersuchten Organen, die Morphin-GT in der Leber, die Bilirubin-GT in keinem Gewebe induzieren.

Als Beispiel für die Bedeutung der Glucuronidierung beim Fremdstoffmetabolismus im intakten Organ wurde der Metabolismus von Naphthalin und Benzo(a)pyren im Rattendünndarm untersucht. Nach Instillation in das Lumen der vaskulär perfundierten Dünndarmschlinge konnten Dihydrodiole und Phenole dieser Verbindungen sowie deren Glucuronide im Portalblut nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Naphthalin, das in erheblichem Maße unverändert resorbiert wurde, wurde Benzpyren zum größten Teil in der Darmmucosa metabolisiert.

## Lebenslauf

Am 1. September 1949 wurde ich, Hans Ulrich Cramer von Clausbruch, als zweiter Sohn des Landwirts Albert Cramer von Clausbruch und seiner Ehefrau Sabine, geborene Freiin Varnbüler, in Rietheim, Kreis Tuttlingen, geboren. Im April 1956 trat ich in die Grundschule in Rietheim ein. Im Frühjahr 1960 wurde ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Tuttlingen aufgenommen, das ich bis zur Reifeprüfung im Juli 1968 besuchte. Von Oktober 1968 bis März 1970 leistete ich die allgemeine Wehrpflicht ab, die ich als Fahnenjunker der Reserve beendete. Zum Sommersemester 1970 nahm ich das Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie in Tübingen auf, das ich im September 1976 mit der Diplomarbeit beendete. Seit Oktober 1976 fertige ich meine Dissertation über das Thema "Untersuchungen zur Charakterisierung von UDP-Glucuronyltransferasen in der Leber und in extrahepatischen Geweben der Ratte" an. Bis November 1977 arbeitete ich im Institut für Toxikologie in Tübingen. Nach Wechsel von Prof. Bock nach Göttingen führte ich meine Doktorarbeit im Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Abteilung für Biochemische Pharmakologie) in Göttingen weiter. Seit Wintersemester 1976 bin ich für das Studium der Humanmedizin immatrikuliert.

Meine akademischen Lehrer waren die
folgenden Professoren und Dozenten:

E. Bayer, K.W. Bock, L. Flohé,
K.G. Grell, J. Guglielmi, S. Hörnle,
H. Krüger, H. Mauser, D. Mecke,
H. Metzner, K. Mörike, H. Probst,
H. Remmer, W. Rüdorff, W. Voelter,
U. Weber, K. Wegmann, G. Weitzel,
A. Wendel, U. Weser

Druck: Polyfoto Vogt KG
Forststr. 58, Tel. 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1

Druck: Polyfoto Vogt KG
Forststr. 58, Tel. 0711/610641-42
7000 Stuttgart 1